Série A, N° 4521
N° d'ordre : 5368

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M. Marcel SIGNOL

Maître-Assistant à la Faculté des Sciences de Paris.

1re **THÈSE.** — MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES, PIGMENTAIRES ET CYTOLOGIQUES INDUITES CHEZ DIVERS GROUPES DE VÉGÉTAUX PAR QUELQUES SUBSTANCES ANTI-CHLOROPHYLLIENNES.

2e **THÈSE.** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ :

" CORRÉLATIONS DE CROISSANCE ET D'INHIBITION ENTRE BOURGEONS. AGENTS ENDOGÈNES ET EXOGÈNES INTERVENANT DANS CES CORRÉLATIONS. "

Soutenues le 14 juin 1965 devant la Commission d'examen.

M. CHOUARD ..... *Président.*
Mme HUREL ..... *Examinateurs.*
M. CAMUS.....

PARIS
LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT
4, RUE DANTE, 4

1965

Série A, N° 4521
N° d'ordre : 5368

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M. Marcel SIGNOL

Maître-Assistant à la Faculté des Sciences de Paris.

1re **THÈSE.** — MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES, PIGMENTAIRES ET CYTOLOGIQUES INDUITES CHEZ DIVERS GROUPES DE VÉGÉTAUX PAR QUELQUES SUBSTANCES ANTI-CHLOROPHYLLIENNES.

2e **THÈSE.** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ :

" CORRÉLATIONS DE CROISSANCE ET D'INHIBITION ENTRE BOURGEONS. AGENTS ENDOGÈNES ET EXOGÉNES INTERVENANT DANS CES CORRÉLATIONS. "

Soutenues le 14 juin 1965 devant la Commission d'examen.

M. CHOUARD ..... *Président.*
Mme HUREL ..... *Examinateurs.*
M. CAMUS.....

PARIS
LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT
4, RUE DANTE, 4

1965

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen..... M. ZAMANSKY

Professeurs :

BRELOT	T	Anal. sup.
PRENANT	T	Anat. et histol. comparées.
GRASSÉ.	T	Evol. des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
WYART	T	Minéralogie et cristallogr.
TEISSIER.....	T	Zoologie.
MANGENOT ...	T	Biologie vég. (Orsay).
AUGER	T	Phys. quant. et relativité.
MONNIER	T	Physiol. générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE	T	Chimie générale
N.....	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du Globe.
Mlle COUSIN..	T	Biolog. animale (S.P.C.N.)
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
BOCQUET.....	T	Zoologie.
KASTLER.....	T	Physique (E.N.S.).
EPHRUSSI ...	T	Génétique.
RIVIÈRE.....	T	Géologie SPCN et Sédim.
GAUTHERET...	T	Biologie végétale (P.C.B.).
R. LUCAS	T	Recherches physiques.
A. THOMAS ...	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MORAND	T	Physique enseignement
SOLEILLET ...	T	Physique (P.C.B.).
FORTIER	T	Mécan. expér. des fluides.
DRACH	T	Zoologie.
QUENEY	T	Météorol. et dyn. atmosph.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHHORN ...	T	Botanique.
DE CUGNAC ..	T	Biologie végét. (S.P.C.N.).
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THELLIER ...	T	Physique du globe.
L'HERITIER...	T	Biolog. gén. (Orsay.)
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay).
PONCIN	T	Mécanique générale.
DUBREIL.....	T	Arith. et théor. des nombr.
QUELET.....	T	Chimie organique.
CAGNIARD.....	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER..	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER ...	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Géologie
TRILLAT	T	Microscop. et diffr. électr.
WIEMANN	T	Chimie organ. et struct.
JACQUINOT ..	T	Spectroscopie et physique céleste (Orsay).
VASSY	T	Phys. de l'atmosphère.
DESTOUCHES .	T	Théories physiques.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minéralogie et cristallogr.
J.-P. MATHIEU	T	Physique (optique).
COUTEAUX ...	T	Cytologie
MAY	T	Zoologie (Orsay).
CHOQUET	T	Théor. des fonct. et topol.
FELDMANN ..	T	Biologie végét. marine
GUINIER	T	Phys. des solides (Orsay)
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des probabilités et physique mathémat.
SCHWARTZ ...	T	Calcul. diff. et intégral.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD ..	T	Aviation (Tech. aéronaut.)
NORMANT ...	T	Synthèse organique gén.
BENARD	T	Chimie minérale.
BUVAT.....	T	Botanique (E.N.S.)
DUGUÉ	T	Statist. mathématiques.
SOULAIRAC ..	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiol. végét. appl.
MARÉCHAL....	T	Optique théor. et appl.
KIRRMANN ..	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD ..	T	Botanique.
Mlle LE BRETON	T	Physiologie de la Nutrit.
LELONG.....	T	Applic. de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS ..	T	Anatom. et Histol. Comp.
EHRESMANN ..	T	Topologie algébrique.
FRANÇON.....	T	Physique (S.P.C.N.).
GLANGEAUD .	T	Géogr. Phys. et Géol. dyn.
OODEMENT ..	T	Mathématiques (M.G.P.).
PISOT	T	Tech. Mathém. de la Phys.
ROCH.....	T	Géologie.
SCHATZMAN...	T	Astrophysique.
TERMIER.....	T	Géologie générale.
ZAMANSKY....	T	Mathémat. générales.
LENNUIER ...	T	Physique (M.G.P.).
RIZET	T	Génétique (Orsay).
ROUTHIER ...	T	Géologie appliquée.
Mme TONNELAT	T	Physique théorique.
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.).
SOUCHAY	T	Chimie générale.
AIGRAIN.....	T	Electrotech. générale.
BRUSSET	T	Chimie systématique.
M. LÉVY	T	Physique théorique des Hautes Energies (Orsay)
Mme CHAIX...	T	Chimie biologique.
Mme HUREL-PY	T	Biologie végétale (P.C.B.).
PANNETIER ..	T	Chimie gén.
BRUN.....	T	Mécan. théor. des fluides.
LEDERER	T	Chimie biologique. (Ors.).
Mme DUBREIL	T	Mathémat. (Agrég.).
Mme LELONG .	T	Mathémat. II (E.N.S.).
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.).
COTTE	T	Physique électricité.
J. E. DUBOIS	T	Chimie organique.
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.).
A. MICHEL....	T	Chimie minérale (Orsay).
OLMER	T	Energétique générale.
ROUAULT	T	Electricité (Orsay)
GAUTHIER....	T	Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ.	T	Chimie physique.
BROSSEL	T	Physique atomique
BUSER	T	Physiologie comparée.
CAMUS.....	T	Physiolog. végét. (Orsay)
CASTAING.....	T	Physique II Thermo (Ors.)
CURIEN.....	T	Minéral. et cristall.
MOYSE	T	Physiol. végét. (Orsay).

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Mme Charniaux Cotton	T	Evol. des êtres organ.
Noirot	T	Evol. des êtres organisés.
Possompes	T	Zoologie.
Pullmann	T	Chimie quantique.
Teillac	T	Phys. nucl. et rad. activit.
Tonnelat	T	Biolog. physico chim. (Ors)
Ville	T	Econométrie.
Willemart	T	Chimie (P.C.B.).
Dode		Chimie (Orsay).
Freymann	T	Recherches physiques.
Guinochet	T	Biolog. vég. SPCN (Orsay).
Rollet	T	Chimie minérale.
Mlle Josien	T	Chimie (S.P.C.N.).
Chevalley	T	Géom. alg. et théor. d. gr.
Arnoult	T	Electronique (Orsay).
Chapelle	T	Physique I (Orsay).
Delange	T	Mathémat. I (Orsay).
Deny	T	Mathémat. gén. (Orsay).
Germain	T	Mécan. théor. des fluides.
G. Lucas	T	Géologie.
Allard	T	Chimie physique.
Berthelot	T	Phys. des particules fondamentales (Orsay).
Bricard	T	Météorologie et phys. de l'atmosphère.
Mme Albe-Fessard	T	Psychophysiologie.
Friedel	T	Phys. des solides (Orsay).
M. Julia	T	Etudes des molécules natur. complexes.
Lender	T	Biol.animale (SPCN) (Ors.)
Magat	T	Physico-chimie des radio-éléments.
Mlle Quintin	T	Electrochimie.
Monod	T	Chimie du métabolisme.
Benoit	T	Physiol. anim. (Orsay).
De Possel	T	Analyse numérique.
Charlot	T	Chimie analytique.
Lemée	T	Ecologie vég. (Orsay.).
Guérin	T	Chimie M.P.C. (Orsay).
M. Chatelet	T	Chimie (P.C.B.).
Jean	T	Physique nucl. (Orsay).
Mattler	T	Physique S.P.C.N.
Bergerard	T	Zoologie (Orsay).
Bertein	T	Electronique (Orsay).
Bouissières	T	Radiochimie.
Mme Couture	T	Therm. et mécan. phys.
Ellenberger	T	Géologie des gr. rég. du gl.
Franc	T	Biol. animale (P.C.B.).
Schnell		Botan. tropicale (Orsay.)
Stolkowski	T	Physiologie végétale.
Acher	T	Chimie biol. (Orsay).
Baudoin	T	Biologie animale P.C.B.
Beaumont		Biologie animale S.P.C.N.
Blamont		Géophysique ionosphère.
Bourreau	T	Botanique.
D. Curie		Physique (M.G.P.).
Durand-Delga	T	Géologie.
Fréon	T	Chimie organ. (Orsay).
Heller	T	Physiologie végétale.
Tortrat	T	Calcul des probabilités.
Cailleux	T	Géologie (S.P.C.N.).
Magnan		Physique, élect.
Daudel	T	Mécan. ondul. appliquée à la chim. théor. et à la phys. nucléaire.
Mlle Fourcroy		Biol. végét. (S.P.C.N.).
Mme Choquet-Bruhat		Mécan. anal. et mécan. cél.
Mlle Veil	T	Physiologie générale.
Lwoff	T	Microbiologie.
Siestrunck	T	Mécan. phys. et expérim.
Lacombe	T	Matéll. des métaux nuclé.
Brochard	T	Physique P.C.B. (Orsay).
Cabannes	T	Mécanique générale.
Lesieur	T	Mathém. I. (Orsay).
Mazet	T	Mécaniq. générale (Orsay).
Caire		Géographie phys. et géol. dynamique.
Comolet	T	Mécanique des fluides.
Corabœuf	T	Physiologie animale. (Ors)
Delloue	T	Physique de l'exosphère.
Gorenflot		Botanique II (Orsay).
Houillon		Biologie animale P.C.B.
J. Jullien		Chimie S.C.N.P. (Orsay).
Malgrange	T	Tech. math. de la physiq.
Olivier		Anthropologie.
Nozeran	T	Botanique II (Orsay).
Blanc-Lapierre	T	Physique E.N.S. (Orsay).
Chevaugeon	T	Botanique (Orsay).
Kahane	T	Mathématiques (Orsay).
Samuel	T	Mathémat. (E.N.S. fém.).
Kourganoff	T	Astronomie (Orsay).
Thiry	T	Mécanique céleste.
Abeles		Physique SPCN.
Amat	T	Physique P.C.B.
Auboin	T	Géologie.
Mme Benoit-Gueutal	T	Physique Nucl. et radio-activité. (Orsay).
Bougis		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer.
Bruhat	T	Mathématiques M.P.C.
Brunn	T	Géologie historique (Orsay)
Chabbal	T	Physique M.G.P. (Orsay).
Deheuvels	T	Mathématique Propé(Ors.).
D'Espagnat	T	Phys. théorique (Orsay).
Furon	T	Géologie S.P.C.N.
Mme Gans	T	Génétique
Geneves		Biologie végétale P.C.B.
Guilbert		Physique (CUS Orléans).
Hupe	T	Pétrographie.
Hollande	T	Biologie générale.
Lions	T	Analyse numérique.
Maitte	T	Chimie P.C.B.
Meyer		Physique propédeutique.
Nicolas		Géologie appliquée.
Panigel		Biologie générale.
Ravier		Pétrographie.
Roseau	T	Mécanique théor. des fluid.
Roubine		Electronique.
Silber	T	Chimie P.C.B.
Uebersfeld	T	Electronique.
Yvon	T	Théories physiques
Hervé	T	Mathématiques.
Néron	T	Mathém. M.P.C. (Orsay).
Mme Pecker-Wimel	T	Astrophysique.
Balkansky		Physique M.P.C.
Le Corre	T	Electricité.
Delcroix	T	Physique théor. (Orsay).
Gourdin		Phys. théor. des Hautes-Energies (Orsay).
Lehmann	T	Phys. Exp. des Hautes Energies (Orsay).
Nataf	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
Echalier		Biologie animale P.C.B.
Barraud		Physiologie cellulaire.
Lioret		Physiologie végét. Orsay
Dars		Géologie struc. et géol. appliquée.
Camefort	T	Botanique (agrégation).
Vichniewsky	T	Mécanique industrielle.
Blaquière		Electronique (Orsay.).
Arnous	T	Physique théorique.
Tatibouet		Chimie (C.S.U. Orléans).
Malliavin	T	Mathémat. propé Orsay
Gaudemar		Chimie Propéd.
Perez y Jorba		Phys. Exp. des Hautes Energies (Orsay).
David	T	Chimie (Agrég. Orsay).
Brousse	T	Mécanique théorique.
Rosch	T	Astronomie.
Guy	T	Physique expérimentale.

Lazard	Math M.P.C.
Morel Pierre	Physique M.P.C.
Arsac	Programmation.
Lefebvre	Chimie M.P.C.
Chapeville ..	Biochimie.
Benoit	Physique C.P.E.M.
Rio	Chimie C.P.E.M.
Jauzein	Géologie E.N.S.
Prévost G. ..	BV C.P.E.M.
Favard P. ...	BV C.P.E.M.
Vilkas	Chimie C.P.E.M.
Mlle Ficini ...	Chimie C.P.E.M.
Lequeux	Astronomie.
Cohen Tannoudji	Physique M.P.C.
Tavernier ..	Physique C.P.E.M.
Mme Roizen...	Physique C.P.E.M.
Durand M. ..	BA S.P.C.N.
Pascaud	Physiologie.
Mme Petit ...	BA C.P.E.M.
Brousse.....	Géologie Orsay.
Cagniac	Physique agrégation Orsay
Leberre	Zoologie (Orsay).
Scheffer.....	Microbiologie (Orsay).
De Gennes ..	Physique des solides (Orsay).
Riou	Physique nucl. exp. Ors.
Clauser.....	Chimie biolo Orsay.
Chevalier....	Physio animale Orsay.
Jancovici	Physique atom. Orsay.
Falk-Vairant.	Physique nucléaire Orsay.
Fetizon	Chimie propé Orsay.
Cerf.....	Mathématiques Orsay.

Secrétaire général ..... R. Poullain

MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES, PIGMENTAIRES ET CYTOLOGIQUES INDUITES CHEZ DIVERS GROUPES DE VÉGÉTAUX PAR QUELQUES SUBSTANCES ANTICHLOROPHYLLIENNES.

par M. **Marcel SIGNOL**

INTRODUCTION

Depuis les remarquables travaux de SCHIMPER et de MEYER [**178**, **132**] sur les plastes, nos connaissances concernant ces organites ont progressé très irrégulièrement. S'il a fallu en effet 70 ans de laborieuses études (1880-1950) pour parvenir à préciser leur forme et leur rôle physiologique, entrevoir leur structure interne, et proposer des théories quant à leur origine, la décade qui vient de s'écouler a suffi pour accumuler, à leur sujet, une somme de connaissances d'importance bien supérieure à celles acquises antérieurement.

Rappelons qu'un tel progrès n'a été possible que grâce à l'utilisation de techniques nouvelles : c'est ainsi que la microscopie électronique a permis de définir avec précision la structure interne des chloroplastes et que l'emploi de techniques chromatographiques a rendu possible l'analyse fine des pigments qu'ils élaborent. Signalons de plus l'utilisation des éléments marqués qui, d'une manière générale, a élargi notre connaissance du rôle physiologique joué par ces organites intracellulaires.

Toutefois, les très nombreuses recherches, dans cette dernière décennie, ont été souvent très spécialisées : certaines ont minutieusement décrit, par exemple, l'infrastructure et l'ontogénie des plastes ; d'autres auteurs ont précisé les voies de synthèse des protéines et des pigments plastidiaux ; d'autres, enfin, ont analysé en détail le rôle des plastes dans la photosynthèse, et, en fait, lorsque nous avons entrepris nos recherches, il n'était encore paru aucun travail essayant de relier structure et métabolisme.

C'est une telle tentative que nous avons essayé de réaliser en intervenant, au moyen de facteurs chimiques, dans la croissance et la pigmentation de divers types végétaux et en suivant simultanément les altérations plastidiales induites par les traitements.

Depuis ce moment, et seulement dans les toutes dernières années, quelques travaux, encore peu nombreux, ont été publiés dans des domaines identiques ou voisins de celui que nous avons nous-mêmes choisi.

***

Notre travail a trouvé son origine dans les observations de Von Euler [38] sur l'action inhibitrice exercée par la streptomycine sur le verdissement des végétaux. Nos recherches furent tout d'abord engagées dans deux directions en utilisant les techniques de la cytologie classique ; c'est ainsi que nous avons, en premier lieu, entrepris une étude approfondie de l'action de cet antibiotique sur les plastes de végétaux supérieurs et inférieurs, puis, nous limitant à un seul groupe végétal, nous avons, en second lieu, analysé l'influence exercée par d'autres substances antibiotiques ou antichlorophylliennes présentant entre elles, sur le plan de la structure chimique, des analogies ou des différences très accentuées. Au cours de cette étude, nous avons choisi de limiter nos essais, en ce qui concerne la diversité du matériel végétal étudié, pour tenter d'élucider les processus intimes des phénomènes observés ; c'est ainsi que nous avons entrepris une analyse des modifications pigmentaires correspondant aux altérations plastidiales observées.

Ces diverses indications une fois obtenues, nous nous sommes alors tournés vers les méthodes de la cytologie électronique. Il nous a paru intéressant, en effet, de tenter d'établir un lien entre les altérations plastidiales observées et les modifications d'infrastructure qu'elles devaient traduire.

Cette étude, réalisée dans des conditions matérielles parfois difficiles, a dû être limitée à l'examen de quelques cas précis et, de ce fait, elle n'a pas fourni l'ensemble des résultats escomptés, le but initialement poursuivi étant d'ailleurs lui-même trop ambitieux. Elle n'en a cependant pas moins permis d'apporter des précisions nouvelles sur la physiologie de l'édification plastidiale chez les végétaux supérieurs.

***

Le mémoire comporte successivement un bref historique, puis l'examen du matériel et des méthodes utilisées, vient ensuite l'exposé de nos recherches personnelles qui comprend cinq parties :

La première rapporte les résultats concernant les modifications de la croissance et de la pigmentation induites par divers facteurs antichlorophylliens.

La seconde est consacrée à l'étude de modifications des pigments foliaires sous l'action de quelques-unes de ces substances.

L'étude cytologique, au microscope photonique, des altérations concomitantes des chloroplastes, constitue la troisième partie.

La quatrième précise les principales étapes de l'édification des structures internes des chloroplastes de Maïs au cours de leur différenciation à partir des proplastes, tandis que la cinquième partie indique les modifications subies par ces structures sous l'action de quelques substances antichlorophylliennes.

Des considérations générales regroupent enfin les résultats obtenus tout en les replaçant dans le cadre des connaissances et des hypothèses actuelles.

*
* *

Ce travail n'a pu être entrepris que grâce à Mme Hurel, Professeur à la Sorbonne, qui nous a permis d'accéder à l'Enseignement Supérieur. Elle nous a toujours manifesté une bienveillante sollicitude, nous fournissant, en particulier, du matériel biologique. De plus elle a accepté de faire partie de notre Jury et nous la prions de trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

M. le Professeur Gautheret, Membre de l'Institut, nous a initié dans son laboratoire aux techniques de la cytologie photonique et ce travail fut ensuite entrepris à son instigation. La formation qu'il nous a donnée a profondément marqué notre esprit et nous ne saurions trop lui faire part de notre gratitude.

La majeure partie de nos expériences fut ensuite réalisée dans le cadre du laboratoire de Travaux Pratiques de Biologie Végétale du P.C.B., dont le directeur, M. Davy de Virville, Maître de Conférences Adjoint à la Sorbonne, nous a toujours témoigné une bienveillance toute paternelle. Il a mis à notre disposition la plupart des moyens matériels qui ont permis la réalisation pratique de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

C'est surtout à M. Camus, Professeur à la Sorbonne, et membre de notre Jury, que vont nos remerciements. Ses judicieux conseils et les nombreuses discussions que nous avons eues, nous ont été précieuses. Nous ne saurons jamais assez l'en remercier et nous lui faisons part ici de notre profonde et amicale sympathie.

Que M. le Professeur Chouard, qui a accepté de présider notre Jury, trouve ici l'expression de nos respectueux remerciements.

Nos remerciements vont aussi à M. Darpoux, Directeur de

l'INRA, Directeur de la station centrale de Phytopathologie Végétale, et à ses collaborateurs, MM. Cornuet et Devergne, qui ont bien voulu mettre à notre disposition leur microscope électronique, après nous avoir initié à son maniement.

Notre amicale reconnaissance va également à M. Morel, Directeur de recherches à l'INRA, qui nous a procuré certains des produits que nous avons utilisés, et à M. Manigault, Chef de Service à l'Institut Pasteur, dont nous avons bien souvent mis à l'épreuve la souriante compétence en matière de photographie et de microscopie.

Que tous nos nombreux camarades et collègues de laboratoire, qui ont contribué à la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de toute notre sympathie.

Enfin, nous avons plaisir à remercier Mlle de Besombes de son dévouement et de l'aide matérielle qu'elle nous a apportée ces dernières années. Ses qualités professionnelles, touchant à la perfection, nous ont été d'un grand secours dans la réalisation de ce travail.

HISTORIQUE

Nous avons été amené, pour ne pas surcharger cet exposé, à ne rapporter, parmi les très nombreux travaux publiés sur les divers sujets abordés dans ce travail, que les étapes essentielles de la progression des connaissances concernant, d'une part, l'action des antibiotiques ou des « antichlorophylliens » sur les végétaux, d'autre part, la structure, l'origine et l'évolution des plastes, et enfin, l'étude des pigments des plastes.

CHAPITRE PREMIER

ACTION DES ANTIBIOTIQUES ET DES SUBSTANCES ANTICHLOROPHYLLIENNES SUR LES VÉGÉTAUX

I. — ACTION DES ANTIBIOTIQUES

Il faut rechercher l'origine de l'étude de l'action des antibiotiques sur les végétaux dans des observations fortuites effectuées sur les animaux. L'isolement, puis la commercialisation des premiers antibiotiques (1940-1944) permirent, entre autres, de guérir de nombreuses maladies chez les animaux et l'on observa, par hasard, que certains traitements par ces substances provoquaient, de plus, une stimulation importante de la croissance des sujets traités.

Ces résultats suscitèrent alors des études portant sur une éventuelle stimulation de la croissance végétale par les antibiotiques, mais les travaux, dans ce domaine, n'aboutirent à aucun résultat spectaculaire. Par contre, fut rapidement démontrée, dans de nombreux cas, la forte toxicité de ces substances, qui pouvaient même, parfois, se traduire par des chloroses très accentuées. C'est ainsi que les travaux de Bustinza et coll. [**14**] et Smith [**194**], signalant une action stimulante de la pénicilline sur la germination de graines, ainsi que ceux de Von Euler [**38**] montrant la phytotoxicité de la streptomycine, furent les premiers éléments d'un vaste ensemble de recherches concernant l'action des antibiotiques sur les végétaux.

Parmi tous ces travaux que nous avons résumés et regroupés l'après la nature des résultats qu'ils apportent, très nombreux furent ceux qui s'attachèrent à étudier la croissance et la morphogenèse des végétaux soumis à l'action d'antibiotiques, alors qu'un petit nombre seulement mentionnèrent les modifications biochimiques qu'ils induisent ; enfin, de rares recherches mirent en évidence des altérations cellulaires, et seulement quelques-unes d'entre elles décrivirent des modifications plastidiales.

A. Sur la croissance et la morphogenèse.

1) *Inhibition.*

D'une manière générale, de très nombreux antibiotiques (streptomycine, tétracycline, auréomycine, terramycine, etc...)

montrèrent une toxicité importante vis-à-vis des végétaux : ils ralentissent la germination des graines, puis le développement des racines et des tiges, cette inhibition augmentant évidemment avec la concentration. Brian [13] a résumé en un tableau regroupant environ 200 publications, les résultats les plus importants concernant les effets phytotoxiques de plus de 10 antibiotiques différents. Parmi ces résultats, il faut noter plus particulièrement ceux obtenus par Crowdy, Pramer et leurs collaborateurs [22, 23] et par Gray [69], qui montrèrent que les antibiotiques neutres ou acides pénètrent et circulent mieux dans la plante que les basiques ou les amphotères. Il convient toutefois de remarquer que la plupart des travaux mentionnés par Brian se rapportent à des observations de courte durée, effectuées souvent dans des conditions non aseptiques.

2) *Stimulation.*

D'une manière générale il ne sera tenu compte, dans ce paragraphe, que des travaux effectués sur milieu de culture aseptique synthétique, c'est-à-dire traduisant théoriquement une action directe de l'antibiotique étudié, à l'exclusion des essais poursuivis en milieu naturel, et, partant, d'interprétation difficile.

Parmi ces travaux, il faut signaler tout particulièrement ceux de Nickell et Finlay [147] qui montrèrent nettement le rôle stimulant que la pénicilline exerçait sur la croissance de *Lemna minor*, et ceux de Camus et Lance [17] qui révélèrent le rôle de substance de croissance que ce même antibiotique peut jouer vis-à-vis du tissu de tubercule de Topinambour. Mentionnons, de plus, que la pénicilline favorise également la formation de racines adventives sur les boutures de diverses plantes [155], ainsi que la croissance et la régénération de prothalles de Fougères cultivés *in vitro* [198, 199].

Par contre, les stimulations induites par les autres antibiotiques sont toujours peu importantes et ne se produisent, en général, qu'à de faibles concentrations. C'est ainsi, par exemple, que, d'après les travaux de Nickell et Finlay [147], la chloromycétine, l'oxytétracycline (terramycine) à la dose de 10^{-6} accélèrent la croissance de *Lemna minor* tandis que ceux de Netien et coll. [141] signalèrent, d'autre part, une légère augmentation de croissance de tissus de Carotte ou de Topinambour sous l'action de faibles cencentrations (10^{-5}) de streptomycine et de chloromycétine. Ces derniers résultats étaient d'ailleurs sujets à caution en raison de la faible stimulation observée, du petit nombre d'échantillons utilisés (huit à neuf par condition) et de l'emploi du critère poids frais pour l'expression de la croissance, car l'action constatée pouvait simplement traduire une augmentation de l'hydratation des tissus. Les mêmes critiques pouvaient être formulées à l'égard

des résultats obtenus par Sotty [197], avec la dihydrostreptomycine, la chloromycétine et la terramycine. Par contre, Lacharme [105], utilisant un schéma expérimental correct, a signalé une nette stimulation de la croissance des tissus tumoraux de Scorsonère cultivés *in vitro* en présence de très faibles doses de tétracycline (5.10^{-9}).

Il semble donc, en résumé, que les antibiotiques soient avant tout, pour les végétaux supérieurs, des inhibiteurs plus ou moins actifs. Seule, la pénicilline, s'est révélée être un facteur capable de jouer un rôle analogue à celui d'une substance de croissance, bien que les stimulations observées sur des matériels particuliers n'aient pas été fréquemment notées par ailleurs.

B. Sur la pigmentation.

Les premières recherches concernant l'influence exercée par les antibiotiques sur la pigmentation ne signalaient, en fait, jusqu'en 1960, que peu d'agents actifs dans ce domaine. Mis à part la streptomycine, seuls l'auréomycine, la terramycine [105, 142, 143, 157, 158, 159] et le chloramphénicol [159] semblaient doués de propriétés antichlorophylliennes.

Plus récemment, divers auteurs, expérimentant surtout sur les Algues unicellulaires, ont montré que des antibiotiques nouvellement isolés étaient, eux aussi, susceptibles de provoquer des chloroses ; certains appartiennent au groupe de la streptomycine : kanamycine, paromycine, néomycine, viomycine [35, 36, 229], d'autres à celui de l'érythromycine : carbomycine, picromycine, spiromycine [36, 37], d'autres enfin, de structure chimique particulière, comme la furadantine [123], l'étamycine [19], ne se rattachent à aucun antibiotique connu.

En 1961, si l'on excepte les recherches de Lacharme [105] sur le mode d'action des tétracyclines, il n'existait donc pas d'étude importante, en dehors des publications indiquées ci-dessus, qui se bornent le plus souvent à mentionner le fait, ni d'analyse détaillée concernant les modifications provoquées par ces substances. De plus, seule l'action antichlorophyllienne de la streptomycine avait fait l'objet de recherches approfondies.

C'est ainsi que Von Euler et coll. par des travaux poursuivis jusqu'en 1951 [39, 40, 41, 42, 43], et qui reprenaient leurs premières observations de 1947, précisèrent que l'action antichlorophyllienne de la streptomycine pouvait s'exercer sur de nombreux végétaux, augmentant en intensité avec la concentration, et n'était pas influencée par divers facteurs biochimiques. Ils signalèrent, par contre, que le chlorure de magnésium protégeait le matériel traité contre les modifications pigmentaires normalement provoquées par cet antibiotique.

En même temps que se poursuivaient ces travaux sur les végétaux supérieurs, Provasoli et coll. [**163**] montraient, d'autre part, que l'on pouvait inhiber la multiplication des plastes chez les Euglènes et obtenir très rapidement une souche décolorée de ces Algues par action de la streptomycine.

Puis, à partir de 1953, parurent un certain nombre de travaux parmi lesquels on peut citer ceux de Bertossi qui, faisant agir l'antibiotique sur des fragments de rhizome de Topinambour mis en culture *in vitro*, obtint, après plusieurs repiquages, une souche dépigmentée, à croissance très lente [**10**]. A ce moment nous avons étudié le mécanisme d'action de la dihydrostreptomycine dans les plantules d'Orge [**186**], et nous sommes parvenus à montrer que l'antibiotique agit au moment de la différenciation des feuilles, alors qu'il est incapable de modifier l'équipement pigmentaire de limbes déjà différenciés.

Les travaux sur l'Orge et sur les Euglènes furent ensuite poursuivis par De Deken-Grenson [**26, 27, 28**], Rosen et Gawlik [**169, 170**], Kirk [**100**], qui précisèrent, ainsi que nous l'avions déjà signalé, que la streptomycine n'agit sur la pigmentation des feuilles de végétaux supérieurs qu'au moment de leur différenciation, et sur les Euglènes, que lors de leur multiplication. Cette inhibition peut être levée par addition au milieu de culture d'un certain nombre de cations : Ca^{++}, Mn^{++}, Sr^{++}, Mg^{++}. Par contre, pour Kirk, seul, ce dernier est susceptible de bloquer l'action de la streptomycine agissant sur des Euglènes étiolées, placées à la lumière, mais ne se multipliant pas.

Enfin, quelques rares auteurs seulement ont étudié quantitativement l'action exercée par la streptomycine sur le contenu pigmentaire de végétaux traités. C'est ainsi que Schopfer et coll. [**180, 182**] montrèrent que cet antibiotique provoque une baisse de la teneur en chlorophylles et en caroténoïdes, alors que Khudairi [**99**], par chromatographie d'un extrait provenant de feuilles altérées de *Xanthium*, précisa que l'antibiotique produit une inhibition de tous les pigments foliaires.

Quant aux autres antibiotiques, qu'il s'agisse des tétracyclines, du chloramphénicol, ou de divers composés récemment découverts, le seul mémoire comportant des indications précises sur les modifications pigmentaires qu'ils engendrent, est celui publié par Lacharme en 1961 [**105**]. Ce travail, qui porte sur l'action des tétracyclines, indique que ces substances provoquent, chez des plantules variées et dans des cultures de tissus, une inhibition simultanée des deux chlorophylles et des caroténoïdes, ce qui les rapproche, quant à leur mode d'action, de la streptomycine.

C. Sur les structures intracellulaires.

Les altérations plastidiales provoquées par les antibiotiques, étudiées par quelques auteurs, seront rapportées en détail dans le deuxième chapitre de l'historique de ce travail.

Outre ces altérations, furent également signalées des modifications du déroulement de la mitose. L'on peut à ce sujet citer les travaux de Wilson et coll. [**226**, **227**] montrant que la pénicilline augmente, dans certains cas, l'activité mitotique, tandis que la streptomycine, l'auréomycine, la terramycine et la chloromycétine provoquent à des degrés divers, des anomalies de la mitose. Pour Tanaka et Sato [**214**], les troubles induits par la streptomycine dans le déroulement de la division nucléaire seraient analogues à ceux que l'on observe sous l'action de diverses radiations mutagènes.

II. — MODE D'ACTION DE LA STREPTOMYCINE

Il nous faut insister à nouveau sur le fait qu'à part les travaux de Lacharme démontrant l'inhibition de la synthèse des pigments foliaires et de la protéogenèse chez les végétaux traités par les tétracyclines [**105**], tous ceux qui furent consacrés à l'étude des troubles du métabolisme des végétaux, provoqués par les antibiotiques, ont trait aux modifications induites par la streptomycine.

Les divers auteurs qui se sont penchés sur ce problème, l'ont souvent abordé sous des angles très différents. Les uns ont essayé de déterminer la ou les réactions métaboliques inhibées par la streptomycine, d'autres ont cherché à lever, par des moyens divers, l'inhibition provoquée par l'antibiotique, chacun accompagnant ses observations d'hypothèses diverses sur le mode d'action de l'inhibiteur. Seuls quelques travaux très récents commencent à nous apporter des renseignements précis sur ce mode d'action.

C'est à Von Euler et à son école que l'on doit l'essentiel des recherches appartenant au premier type. Ces auteurs, dès 1948, suggèrent, en effet, que la streptomycine précipite le complexe pigmentaire plastidial, la chloroplastine, ainsi que les acides ribo- et désoxyribonucléiques, empêchant ainsi la différenciation des plastes [**42**]. Ils montrèrent, d'autre part, que certains produits de dégradation de l'antibiotique, tels que la streptidine, agissaient de manière analogue à celle de la molécule intacte, et bloquaient, en particulier, la catalase [**43**]. Enfin, plus tard, ils pensèrent que l'inhibition de la chlorophyllogenèse était due à une altération du radical phytol [**41**].

Pendant cette même période, d'autres auteurs suggérèrent des hypothèses différentes. C'est ainsi qu'en 1949, Lwoff et Schaeffer envisagèrent une inhibition compétitive de la chlorophylle par

l'antibiotique [**122**] et qu'un peu plus tard Schaeffer attribua une « action granulostatique » à la streptomycine [**176**].

Cependant, en 1955, De Deken-Grenson [**27**] estima que, chez l'Orge, l'hypothèse de Lwoff et Schaeffer ne pouvait s'appliquer, car la streptomycine n'empêchait pas les plantules d'Orge étiolées de reverdir à la lumière. D'autre part, l'antibiotique ne modifiait pas l'activité respiratoire de feuilles même chlorotiques. Enfin, constatant, dans les tissus foliaires, d'une part, un arrêt de la synthèse de l'ARN et des protéïnes, et d'autre part, une accumulation d'acides aminés libres, cet auteur pensa que l'antibiotique inactivait l'ARN responsable de l'incorporation des acides aminés dans les protéines chloroplastiques. D'autres études menées par ces mêmes auteurs sur des Euglènes, que l'on veut facilement « déplaster » en présence de streptomycine [**29**], ne permirent toutefois, pas plus que les précédents, de préciser le mode l'action exact de l'antibiotique.

C'est encore Von Euler qui, le premier, tenta de lever l'inhibition de la chlorophyllogenèse induite par la streptomycine. Il constata que, ni l'addition de vitamine B_1 ou de lactoflavine au milieu de culture, ni celle d'acides nucléiques, ne rétablissait la pigmentation foliaire des plantules [**39**]. Par contre, cet auteur remarqua que le chlorure de magnésium supprimait partiellement, dans les feuilles de *Spinacia*, la chlorose provoquée par l'antibiotique [**39, 40**]. Ces travaux furent repris et continués par Rosen qui montra que certains cations divalents (Ca^{++}, Mn^{++}) pouvaient jouer un rôle analogue [**169**]. Sato [**174, 175**], étendant cette étude, indiqua que des cations monovalents avaient un effet identique (Na^{+}, K^{+}, Li^{+}) et que des plantules issues de graines traitées par la streptomycine, puis rincées par de l'eau à pH inférieur à 5, pouvaient verdir normalement. Enfin, toujours dans le même ordre d'idées, Rubin et Ladygina [**173**], montrèrent que l'action des cations divalents, Mn^{++} et Fe^{++} en particulier, n'est pas identique, et que le verdissement des feuilles chlorotiques observé en présence de l'un ou l'autre de ces métaux, se ferait selon des processus différents.

Donc, en dépit d'études bien conduites, mais probablement en raison du nombre des cations actifs dans le processus d'inhibition et du rôle que chacun de ceux-ci peut jouer dans le métabolisme cellulaire, les résultats obtenus n'ont guère fait progresser le problème du mode d'action de la streptomycine. En fait, les seules observations modernes constructives sont dues à Kirk [**100, 101**] qui étudia l'incorporation de composés marqués dans des Euglènes soumises à des conditions expérimentales variées. C'est ainsi que cet auteur, montra que des Algues étiolées, en présence d'antibiotique, étaient incapables d'incorporer aussi bien de l'acétate $1\text{-}^{14}C$

que de la leucine marquée dans leurs acides nucléiques et leurs protéines, tant à la lumière qu'à l'obscurité. Ces observations confirment, par des techniques expérimentales différentes, certains des résultats antérieurs de De Deken-Grenson.

La revue que nous venons de faire des principales recherches sur le mode d'action de la streptomycine sur les végétaux, montre que le problème est, en effet, très complexe, l'antibiotique, outre une inhibition des pigments foliaires, étant susceptible d'intervenir dans de nombreuses réactions du métabolisme cellulaire. Le fait essentiel mis en évidence paraît être un blocage de la synthèse des protéines chloroplastiques qui serait produit par une inhibition de l'activation des acides aminés libres. Ces dernières hypothèses formulées par Von Euler puis par De Deken-Grenson rejoignent celles émises par Spotts et Stanier [200] à la suite d'observations effectuées sur *Escherichia coli*, et qui situent l'action de la streptomycine au niveau des ribosomes. Chez les souches sensibles, l'antibiotique en altérerait la structure, rendant alors impossible la transcription par l'ARN de transfert des séquences normales d'aminoacides, et, par voie de conséquence, la synthèse des protéines. Signalons en outre que ces deux auteurs, ainsi d'ailleurs que Davis et coll. [5] pensent que, dans le cas de la Bactérie, la streptomycine interviendrait au préalable dans la structure de la membrane ectoplasmique.

III. — ACTIONS D'AUTRES SUBSTANCES PROVOQUANT DES CHLOROSES VÉGÉTALES

Les recherches poursuivies au cours des quinze dernières années dans le domaine des phytohormones ont abouti à la découverte de nombreux herbicides, dont quelques-uns possèdent également la propriété de perturber considérablement la synthèse des pigments foliaires chez les plantes traitées. Toutefois, parmi les nombreuses substances susceptibles de provoquer des chloroses chez les végétaux supérieurs, seules certaines d'entre elles ont fait l'objet d'études plus ou moins approfondies en ce qui concerne la symptomatologie des troubles qu'elles déterminent et leur mode d'action.

C'est ainsi qu'en 1951, Alamercery, Hamner et leurs collaborateurs [2, 83], étudiant les propriétés de nombreux dérivés de l'acide tétronique, remarquèrent que certains d'entre eux inhibaient la pigmentation des feuilles de plantules traitées, le plus actif de ces produits étant l'acide 3-(α-iminoéthyl)-5-méthyltétronique (AAMT). D'autre part Hall et coll. [82] montrèrent que le 3-amino-1, 2, 4-triazole (AT) était un puissant inhibiteur de la croissance végétale, provoquant, à certaines concentrations, une chlorose irréversible des feuilles. Certaines triazines détermine-

raient également de tels symptômes [**134**]. Enfin Gray et Hendlin [**70, 71**] provoquèrent sur des végétaux, des phénomènes analogues par action de l'O-méthylthréonine.

Dans l'ensemble, ces différents composés ne firent l'objet, en ce qui concernait les modifications pigmentaires et cytologiques qu'ils induisent, que de travaux très fragmentaires. Signalons simplement dans ce domaine les recherches de Schopfer et coll. [**181**], qui mirent en évidence le fait que l'AAMT était plus actif que la streptomycine sur le Pois, et ceux de Srivastava [**201**] qui montrèrent que l'AT provoquait de graves anomalies de la mitose. D'autre part les quelques publications qui décrivent les altérations plastidiales causées par l'AAMT et l'AT, ou les triazines, seront mentionnées au deuxième chapitre du présent historique.

Quant au mode d'action de ces divers composés, il n'a fait l'objet de recherches précises qu'au cours de ces dernières années, et encore convient-il de remarquer que celles-ci n'ont guère porté que sur l'AT.

C'est ainsi que selon Sund et coll. [**212**] l'AT inhiberait, chez la Tomate, la formation de la riboflavine, tandis que Carter et Naylor [**18**] pensèrent qu'il interviendrait dans le métabolisme de la glycine et de la sérine en formant avec ces acides aminés des complexes stables. Pour Nichols [**146**], cette substance bloquerait l'action de la catalase en s'unissant à la partie protéique de l'enzyme. Par ailleurs, Fredrick et Gentile, puis Fredrick [**45, 46, 47**], émirent l'hypothèse que l'AT pourrait, d'une part chélater le manganèse et, d'autre part, former des complexes avec le glucose-1-phosphate, provoquant alors une inhibition de la phosphorylase.

Ici encore, la situation semble donc très confuse, tous ces travaux indiquant que l'AT peut intervenir dans de nombreuses réactions. La diversité des matériels biologiques utilisés rend, de plus, difficile une étude comparative des différents faits rapportés.

Quant à l'O-méthylthréonine, les seules informations que l'on possède sur son mode d'action sont dues aux travaux publiés en 1962 par Gray et Hendlin [**71**]. Ces auteurs, étendant et précisant leurs recherches antérieures, constataient alors, en même temps d'ailleurs qu'Aaronson et Bensky [**1**], que l'isoleucine était susceptible de bloquer l'action de ce composé.

IV. — CONCLUSIONS

La brève revue que nous venons de faire concernant l'action des antibiotiques et les composés antichlorophylliens sur les végétaux, permet de se rendre compte que, si de nombreux travaux concernent les transformations morphologiques induites par ces substances, les études biochimiques publiées actuellement ne

peuvent permettre de formuler sur leur mode d'action que quelques hypothèses encore très fragmentaires.

Il semble que la principale d'entre elles, qui doit retenir particulièrement notre attention, concerne l'action de ces composés sur la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Divers auteurs ont montré que les tétracyclines, aussi bien que la streptomycine et l'AT, intervenaient dans l'une ou l'autre de ces synthèses essentielles. Quant au mode d'action des antibiotiques sur la formation des pigments plastidiaux, de nouvelles recherches devront le préciser.

CHAPITRE II

LES CHLOROPLASTES

I. — STRUCTURE, ORIGINE, DÉVELOPPEMENT

A. Observations en microscopie photonique.

Bien que les chloroplastes aient été entrevus par Leuwenhoek vers 1676, ce n'est que dans la seconde moitié du XIX^e^ siècle que des progrès remarquables furent réalisés dans nos connaissances relatives à ces organites. C'est vers cette époque, en effet, que Schimper et Meyer [**132**, **133**, **177**, **178**, **179**] affirmèrent l'hétérogénéité des chloroplastes, indiquant qu'ils étaient constitués de grana noyés dans un stroma entouré d'une membrane limitante. C'est à ces auteurs, également, que l'on doit l'idée que les plastes ne se formeraient jamais *de novo* dans les cellules, bien qu'ils n'en apportèrent pas la démonstration dans le cas des végétaux supérieurs.

Il convient cependant de souligner que ces observations et hypothèses, confirmées ou largement admises dans les six ou sept décades qui suivirent, avaient été soit précédées, soit accompagnées d'autres théories maintenant abandonnées. C'est ainsi que pour Nageli [**140**] les chloroplastes étaient des vésicules, pour Bohm [**12**] une masse de cytoplasme vert, alors qu'Haberlandt [**81**] considérait que ces organites avaient une structure fibrillaire.

On peut attribuer les divergences relevées entre les observations des différents auteurs, en partie à ce qu'ils travaillaient sur des matériels différents, mais surtout à ce que ceux-ci présentaient des altérations plus ou moins accusées dues au fait que l'on ignorait, à cette époque, l'emploi des fixateurs cytologiques. Aussi, entre 1890 et 1910, probablement en raison des nombreuses difficultés rencontrées, ne parut-il plus alors qu'un très petit nombre d'observations.

Il fallut attendre les travaux de Pensa [**152**] et de Lewitsky [**115**, **116**] qui utilisaient les techniques de fixation mettant en évidence les mitochondries animales (techniques mitochondriales), pour que les recherches sur les plastes et leur origine prennent un nouvel essor. Pour ces deux chercheurs, les chloroplastes dérivaient d'organites analogues aux chondriosomes des cellules animales.

Ce fut à cette même époque que Guilliermond [72, 73], employant des techniques identiques, démontra la généralité du chondriome dans les cellules végétales. Puis, dans une série de travaux remarquables, cet auteur et son école, établirent ensuite la dualité du chondriome ; ce système d'organites, identiques cytologiquement dans les méristèmes, se scinderait en une double lignée, l'une d'elles donnant les plastes, ou « chondriome actif », qui interviendrait dans la photosynthèse, l'autre, « le chondriome inactif », dont le rôle, à l'époque, n'était guère précisé. Depuis ces travaux, les recherches sur les plastes connurent un essor qui ne s'est pas ralenti.

C'est ainsi que la structure interne des plastes était progressivement précisée, en particulier grâce aux travaux de Doutreligne [32], Heitz [84, 85], Weier [222], qui, repris et continués par d'autres chercheurs, démontrèrent, de manière irréfutable, la présence de grana à l'intérieur des chloroplastes. Heitz [84, 85] leur assigna une forme discoïde, la taille de ces corpuscules variant d'une espèce à l'autre, et pour une même espèce selon la saison [8].

Simultanément à ces découvertes, Metzner [131], grâce au microscope à U.V., précisa que la chlorophylle devait se trouver fixée sur les grana, et Menke [128], puis Menke et Kuster [129], émirent alors l'idée que le chloroplaste serait formé d'un empilement de lamelles submicroscopiques. Ces divers travaux suggérèrent à Frey-Wyssling, dès 1937 [48], une hypothèse féconde selon laquelle les chloroplastes seraient formés de lamelles constituées de couches successives de protéines et de lipides auxquelles seraient associés les pigments plastidiaux : chlorophylles et caroténoïdes. Enfin les recherches de Strugger [205] établirent que les grana sont formés de disques empilés les uns sur les autres, ces disques étant en relation avec des lamelles s'étendant d'un bout à l'autre du plaste.

Ainsi donc, par des observations extrêmement précises, à la limite des possibilités de leur microscope, les cytologistes classiques avaient réussi à assigner aux chloroplastes une structure interne que le microscope électronique n'a fait que confirmer en la précisant.

Examinons maintenant quelles étaient à ce moment (1953-1954), les théories sur l'origine et l'évolution des plastes et plus particulièrement des chloroplastes.

Aussitôt formulée, la théorie de Guilliermond fut, dès 1919, combattue par P.A. Dangeard [24] qui considéra que le chondriome et l'ensemble des plastes (plastidome) constituaient des lignées distinctes. Plus récemment, Newcommer [144, 145], n'acceptant la position d'aucun des deux auteurs français, affirma que tous les chondriosomes (mitochondries et chondriocontes) pou-

vaient donner des plastes, une partie seulement d'entre eux se différenciant au hasard.

C'est alors que se situent les travaux de STRUGGER et son école [206, 207] qui, utilisant la coloration vitale à la Rhodamine B et la fixation à l'acide osmique, mirent en évidence, dans les cellules méristématiques de *Chlorophytum* et d'*Agapanthus*, des proplastes pourvus, dans un stroma incolore, d'un petit disque de 0,5 à 1 μ fortement colorable. Ce disque, qu'il appela « primärgranum », susceptible de duplication et porteur de facteurs génétiques, serait, selon l'auteur, à l'origine des grana observés dans les chloroplastes normalement développés et désignés sous le terme de « sekundärgrana ». Remarquons d'ailleurs, à ce propos, que certains cytogénéticiens qui s'étaient penchés sur le problème de la pigmentation des feuilles panachées ou de celle de plantes hybrides, avaient émis, avant STRUGGER, l'hypothèse que les chloroplastes porteraient un facteur génétique extranucléaire [25, 79, 167]. Les observations de STRUGGER semblaient démontrer la continuité des plastes et la validité de la théorie ancienne de SCHIMPER et MEYER. Elles permettaient, en outre, d'attribuer au granum primaire, le rôle de support des facteurs génétiques extranucléaires propres aux plastes. Toutefois cette théorie, opposée à celle de la dualité du chondriome formulée par GUILLIERMOND, ne fut pas admise par tous, et, en particulier, par HEITZ et MALY [88] qui, utilisant un matériel biologique identique, ne purent retrouver la présence systématique d'un granum primaire dans les proplastes.

B. RECHERCHES ACTUELLES EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE.

Depuis les premières observations de KAUSCHE et RUSKA [97] mentionnant la présence, dans les proplastes de grana, et de lamelles, l'étude de ces organites, en microscopie électronique, a fait des progrès rapides, surtout dans la dernière décade. Toutefois, les travaux de KAUSCHE et RUSKA, pas plus que ceux d'ALGERA et coll. [4], de GRANICK et PORTER [67], de FREY-WYSSLING et MUHLETHALER [51] effectués sur des chloroplastes isolés et plus ou moins altérés, n'apportèrent de résultats définitifs et il fallut attendre les travaux de STEINMANN [202, 203, 204], puis ceux de FINEAN et coll. [44] employant pour la première fois la technique des coupes ultraminces chez les végétaux, pour que des observations réellement fines puissent être réalisées. Il faut cependant remarquer qu'en dépit de l'imprécision des résultats obtenus au cours des premières années, avait été cette fois réellement mise en évidence l'existence d'une structure lamellaire des grana et du stroma, confirmant ainsi les hypothèses avancées par FREY-WYSSLING dès 1937.

La structure des chloroplastes « adultes » de nombreux végétaux, aussi bien inférieurs que supérieurs, fut ensuite progressivement

précisée, tandis que d'autres chercheurs entreprenaient l'étude de l'évolution de l'infrastructure des plastes au cours de leur différenciation, ainsi d'ailleurs que celle de leurs modifications sous l'action de divers facteurs.

Examinons maintenant, très brièvement, l'état actuel de nos connaissances sur ces divers points, en nous limitant aux plastes des végétaux supérieurs, puisque c'est sur eux, principalement, qu'a porté notre travail.

1) *La structure des chloroplastes.*

Actuellement, on représente, en général, un chloroplaste de végétal supérieur, comme un organite lenticulaire de 4 à 10 μ de longueur et de 2 à 3 μ d'épaisseur, limité par une double membrane de 180 Å, qui renferme un stroma, ou matrix, formé de protéines globulaires hydrophiles. Au sein de ce stroma, qui peut contenir des globules lipidiques et des enclaves amylifères, on observe un système lamellaire complexe formé de couches lipoprotéiques portant les pigments plastidiaux. Ces lamelles comprennent, d'une part, celles qui constituent les grana, formés de saccules arrondis, aplatis, empilés dans le chloroplaste adulte, et, d'autre part, en relation avec ces grana, les lamelles intergrana, ou lamelles de stroma, qui sont en fait de longs saccules s'étendant en général d'une extrémité à l'autre du plaste.

Si l'on est maintenant fixé sur la structure et les rapports existant entre les différents systèmes lamellaires, il aura cependant fallu presque une dizaine d'années pour éclaircir définitivement ces questions.

En effet, si pour Stubbe et Von Wettstein [**211**], il n'existait que de grands saccules dont les parois, épaissies par endroits, constituent les grana et si pour Hodge et coll. [**90**] les grana se formaient par simple bifurcation des lamelles intergrana, on admet maintenant, de manière générale, grâce aux travaux de Steinmann et Sjöstrand [**204**] et à ceux plus récents de Wehrmeyer et Perner [**221**] que les lamelles intergrana sont des saccules aplatis supportant par endroits les saccules plus petits que sont les grana.

Il existe cependant des exceptions à ce schéma général et c'est ainsi, par exemple, que Hodge et coll. [**90**], confirmant les observations faites au microscope ordinaire par Rhoades et coll. [**168**], ont signalé que les chloroplastes des cellules du parenchyme entourant les faisceaux cribro-vasculaires des feuilles de Maïs, ne possèdent pas de grana, mais seulement des lamelles de stroma, alors que ceux des cellules du parenchyme lacuneux présentent une structure normale. De tels plastes sans grana se rapprochent beaucoup, du point de vue de la structure, de ceux que l'on observe ordinairement chez certains végétaux inférieurs, et notamment chez les Algues.

2) *Origine et différenciation des chloroplastes.*

On pensait que le microscope électronique permettrait de distinguer aisément, dans le méristème des végétaux supérieurs, les plastes très jeunes, ou proplastes, du chondriome, et ce problème a suscité de nombreuses recherches. Or, les résultats obtenus furent différents selon les auteurs, et peuvent être groupés en deux catégories : d'une part, ceux qui, dans le méristème, distinguent facilement les mitochondries des proplastes, grâce à un corpuscule contenu à l'intérieur de ces derniers organites, et, d'autre part, ceux pour lesquels l'ensemble des organites présente la même morphologie.

Les travaux les plus anciens s'insérant dans la première catégorie sont ceux de Leyon [**117**, **119**, **120**], étudiant la structure des plastes de *Taraxacum* et d'*Aspidistra*. Cet auteur signala l'existence d'un « dense core » qui serait à l'origine du système lamellaire interne du chloroplaste. Ce corpuscule, le granum primaire de Strugger, fut, d'autre part, retrouvé dans les proplastes de diverses monocotylédones par Heitz [**86**], Mühlethaler [**136**], Perner [**153**, **154**], Hodge et coll. [**89**], et de quelques dicotylédones par Heitz [**87**], Strugger et Perner [**209**]. Mais, tandis que Leyon, Mühlethaler, Strugger et Perner, voyaient dans ce granum primaire l'origine et le support de la lignée plastidiale, Heitz pensa qu'il ne se formait que secondairement dans le proplaste, au moment de la différenciation de celui-ci, quand il devenait chlorophyllien. Pour ces divers auteurs, à l'exception de Heitz, l'existence de ce corpuscule, initiateur de la structure interne du plaste, constituait la preuve irréfutable de la validité de la vieille théorie de Schimper sur la continuité des plastes, et s'opposait absolument à l'hypothèse de la dualité du chondriome défendue par Guilliermond. Il faut toutefois signaler que Hodge et coll. [**89**] faisaient intervenir parallèlement, dans l'édification des lamelles internes, le granum primaire et la double membrane limitant le plaste.

Cependant, d'autres travaux parus ensuite, ceux de la deuxième catégorie, s'opposaient à ces observations. C'est ainsi, en effet, que Buvat [**16**], Lance [**107**], Gerola et coll. [**56**, **57**], ne mentionnaient pas la présence d'un corpuscule dans les proplastes des cellules méristématiques les plus indifférenciées. Ces auteurs, d'ailleurs, ne distinguaient que très difficilement les proplastes des jeunes mitochondries, et seules, leurs dimensions légèrement supérieures et leur pauvreté en crêtes permettaient de les identifier. Pour eux, la théorie de Guilliermond semblait toujours valable, car les plastes et les chondriosomes avaient une forme et une structure si voisines que le microscope électronique ne pouvait permettre de les distinguer nettement ; d'autre part, ils admettaient que le système lamellaire du plaste se formait à partir d'invaginations du feuillet interne de la double membrane limitant le plaste. Selon Buvat [**16**]

et Lance [107], ces invaginations édifieraient des crêtes sur lesquelles se différencieraient les saccules aplatis constituant les grana.

La confrontation de ces résultats divergents amenèrent différents chercheurs à tenter d'élucider les raisons de cette situation et l'on s'est alors aperçu, grâce à diverses observations de Hodge et coll. [89, 91], de Mühlethaler et coll [137], de Lefort [110], de Gerola et coll. [57, 58], et surtout de Von Wettstein [224], que l'existence ou l'absence de granum primaire dépendait des conditions d'éclairement. Selon ce dernier auteur, le feuillet interne de la double membrane limitant le proplaste émettrait vers l'intérieur, par invagination, des vésicules qui, sous l'action d'une intensité lumineuse suffisante, édifieraient, par coalescence et fusion, le système lamellaire du plaste. A l'obscurité, ou sous une lumière insuffisante, ces vésicules, incapables de s'orienter, s'agglomèreraient en une masse globuleuse, pouvant parfois prendre l'aspect d'un réseau pseudo-cristallin, constituant le granum primaire de Strugger. Une augmentation ultérieure de l'intensité lumineuse permettrait aux vésicules formant ce granum de s'aligner et d'édifier des lamelles, la taille du granum diminuant jusqu'à devenir nulle au fur et à mesure de l'édification de ces lamelles.

Ces remarquables observations, généralement admises actuellement, qui confirmaient la théorie du « primärgranum » de Strugger, ne permettaient pas cependant d'expliquer le fait que certaines recherches, effectuées sur un même matériel biologique, et, parfois dans des conditions de lumière identiques, ne concordaient pas ou pouvaient même se contredire. C'est ainsi, par exemple, que chez *Elodea*, Strugger [208] décrivit la présence systématique d'un granum primaire, tandis que Lefort [110] ne l'observa qu'à certains stades de la différenciation et que Buvat [16] et Mühlethaler et coll. [137] n'en signalèrent pas la présence dans des conditions normales d'éclairement. A la suite d'observations effectuées sur le Maïs [190], nous avons alors émis une hypothèse qui pouvait, dans certains cas, permettre d'interpréter ces divergences. Nous y reviendrons dans l'exposé de nos recherches personnelles.

Quoiqu'il en soit, les diverses observations rapportées ont démontré que la lumière joue un rôle très important lors de la différenciation des proplastes en chloroplastes. Il semble donc difficile, dans ces conditions, de tenir pour valable la théorie, proposée en 1956 par Hodge [89, 91], dans laquelle il affirme que le mode de différenciation des proplastes en chloroplastes est identique à celui que l'on observe lorsque des plastes de plantules étiolées verdissent sous l'action de la lumière, bien que de nombreux chercheurs, étudiant, au point de vue biochimique, la différenciation des chloroplastes, aient basé leur expérimentation sur les conclusions de cet auteur [33, 103, 104, 219]. Les résultats obtenus dans ces

conditions ne paraissent pas susceptibles, *a priori*, d'être transposés à la différenciation normale des chloroplastes à partir des proplastes sous l'action de la lumière, car les proplastes des régions méristématiques ne sont, en aucun cas, identifiables aux plastes différenciées des feuilles étiolées.

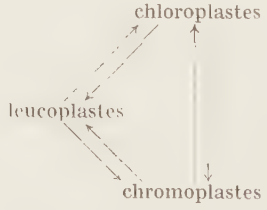
En conclusion, si la microscopie électronique n'a pas encore permis de trancher nettement le problème de la continuité des plastes, elle n'en a pas moins souligné la complexité de cette question et l'importance du rôle que jouent les conditions de culture du matériel biologique dans l'édification de l'infrastructure plastidiale.

II. – ÉVOLUTION ET MODIFICATION DES CHLOROPLASTES SOUS L'ACTION DE DIVERS FACTEURS

Les chloroplastes, comme tous les plastes, ne sont pas des organites à structure immuable. Ils sont susceptibles de se modifier sous l'action de divers facteurs, certaines modifications se produisant naturellement lors du développement du végétal, alors que d'autres peuvent être induites par des agents physiques ou chimiques.

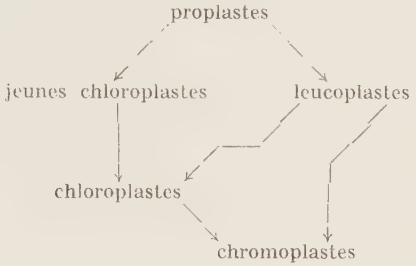
A. Modifications naturelles.

En dehors des processus d'évolution normaux, tels que leur différenciation, à partir des proplastes, en chloroplastes ou en leucoplastes dans les tiges et les racines, les plastes sont susceptibles de subir diverses modifications dans des conditions naturelles. C'est ainsi que les transformations de chloroplastes en chromoplastes, de leucoplastes en chromoplastes ou en chloroplastes, déjà décrites par Schimper [**178**], furent précisées depuis par de très nombreux chercheurs utilisant la microscopie photonique. Il était d'ailleurs admis, à la suite de Schimper, que ces modifications naturelles étaient réversibles et qu'elles pouvaient être schématisées de la manière suivante :



A cette théorie, Frey-Wyssling et coll. [**52**], se basant sur des études de chloroses, de panachures ou de maturation de fruits,

opposèrent le schéma suivant, selon lequel l'évolution des plastes serait « monotrope », non réversible :



S'il est indubitable que certains faits militent en faveur de cette dernière hypothèse, notamment la formation des chromoplastes lors de la maturation des fruits, il n'en est pas moins exact que des chromoplastes et des chloroplastes de cellules non sénescentes, peuvent faire retour à l'état de proplastes et subir ensuite, après cette dédifférenciation, une nouvelle différenciation [**15**].

L'étude de cette question, en microscopie électronique, qui devait permettre d'élucider ce point, n'a pas encore, en fait, apporté de précisions importantes. Frey-Wyssling et Kreutzer [**49, 50**], ainsi que Lance-Nougarède [**108, 148**] montrèrent comment, partant de chloroplastes à structure lamellaire. on passait aux chromoplastes par disparition de cette structure et formation, soit de tubules dans le cas du fruit de *Capsicum*, soit de globules osmiophiles dans celui des pétales de *Ranunculus*, de *Chrysanthemum* ou de *Spartium*. Gerola et coll. [**61**] étudiant la transformation de leucoplastes en chloroplastes dans le parenchyme vasculaire de rhizome de Topinambour mis en culture, décrivirent l'édification du système lamellaire interne du chloroplaste aux dépens d'un « corpo opaquo » présent dans le leucoplaste, apportant ainsi une autre confirmation à la théorie de la transformation monotrope de Frey-Wyssling. Par contre, Lance-Nougarède [**109**] mentionna une régression de chloroplastes en proplastes lors de l'initiation des méristèmes floraux de *Chrysanthemum*. La question ne semble donc pas tranchée de manière irréfutable.

D'autre part, le problème des rapports existant entre pigmentation et structure plastidiale fit l'objet d'études assez nombreuses à partir de différents matériels particuliers.

C'est ainsi que, sur des hybrides interspécifiques d'*Oenothera*, particulièrement étudiés par Renner [**164, 165, 166**], il est possible d'observer au microscope des plastes peu ou pas chlorophylliens, à partir de feuilles plus ou moins pigmentées que produisent certains d'entre eux. Stubbe et Von Wettstein [**211**],

reprenant l'étude de ces matériels en microscopie électronique, constatèrent qu'à l'altération de la pigmentation correspondait une modification de l'ultrastructure des plastes, qui se traduit dans les parties les plus dépigmentées, par une absence de système lamellaire. Ne subsistaient plus alors que quelques vésicules ; dans d'autres cas, tel que celui du type *suaveolens*, par exemple, des lamelles se développaient dans le jeune plaste, puis se disloquaient et disparaissaient dans le plaste adulte. D'une manière générale, la taille du plaste n'était pas modifiée de manière très importante.

Un autre matériel, intéressant pour l'étude du problème de pigmentation dans les conditions naturelles, est fourni par certaines chimères sectorielles (*Pelargonium*) ou panachures (*Liriope*, *Chlorophytum*) qui apparaissent spontanément. Les cellules des régions non pigmentées de ces feuilles possèdent, en effet, des chloroplastes altérés jaune pâle ou incolores. Dans une étude récente, Murakami et coll. [**138**, **139**] montrèrent que, chez *Liriope*, les plastes altérés des régions blanches ne possédaient pas de système lamellaire interne, mais seulement des vésicules et des globules osmioréducteurs. Les proplastes des régions méristématiques étaient tous identiques, qu'ils donnent naissance par la suite à des chloroplastes normaux ou à des plastes dépigmentés dépourvus de lamelles.

L'ensemble de ces observations démontrait donc qu'il existe une relation entre la présence de chlorophylle et l'existence d'un système lamellaire.

B. Modifications induites par divers facteurs externes.

De très nombreux facteurs sont capables, dans certaines conditions, de provoquer des chloroses végétales : température, rayonnements divers, excès de certains éléments tels que le rubidium, ou au contraire, carences de certains autres (Fe, Mg), composés chimiques divers. Nous n'examinerons ici que quelques exemples parmi les plus caractéristiques.

1) *Facteurs physiques.*

Klein [**103**] a montré que les basses températures (3°) inhibaient le verdissement ainsi que l'édification normale du système lamellaire interne des plastes de feuilles étiolées de Maïs placées à la lumière. Remis à 26°, l'échantillon reverdissait et présentait alors une structure normale. Inversement, une température élevée (33°) provoquait une dépigmentation d'*Euglena gracilis* [**28**, **160**, **162**]. D'autre part, ce dernier organisme soumis à une irradiation ultraviolette perd également sa chlorophylle [**28**, **161**]. Le site sensible aux radiations U.V. serait situé dans le cytoplasme et non dans le noyau [**63**].

Par ailleurs, de nombreuses mutations produites sous l'influence de rayons X, de neutrons ou de rayonnements α, β et γ, affectent la synthèse des pigments. Cette question a fait l'objet d'importants travaux et en particulier ceux de Gustafsson et coll. [78, 79, 80, 92, 150], de Von Wettstein [223] et de Lefort [111]. D'une manière très générale, ces auteurs montrèrent que l'on observait, parallèlement à la disparition des pigments chez les mutants, une altération de l'ultrastructure des plastes. Ces organites, chez les mutants *Viridis*, ne possèdent qu'un système lamellaire réduit. On n'observe plus qu'un très petit nombre de lamelles dans les plastes des mutants *Xantha*, tandis que chez les *Albina*, seules subsistent des vésicules dispersées dans le stroma ou groupées en amas irréguliers.

2) *Facteurs chimiques.*

Examinons maintenant quelques exemples de chloroses provoquées soit par des carences diverses, soit par des substances chimiques chez les divers matériels expérimentés.

Strunk et Wartenberg [210], maintenant des plantules de Maïs en inanition, observèrent une perte de leur pigmentation accompagnée d'une altération de la structure plastidiale, caractérisée par une absence totale ou presque des lamelles. En cas de déficience complète du système lamellaire, de gros globules osmiophiles s'accumulaient dans les plastes. Par contre, l'addition d'éléments nutritifs au milieu de culture permettait de revenir à une pigmentation et à une structure normales. Il convient de remarquer que ce type d'altération est différent de celui que l'on observe dans une feuille sénescente, car dans ce dernier cas, de gros globules prennent la place des lamelles internes du plaste et le phénomène est irréversible. Gerola et coll. [60], se livrant à la même expérience sur le Tabac, obtinrent des résultats identiques. A la suite de ces travaux, de nombreux auteurs montrèrent qu'une carence en l'un des ions SO_4^{--}, PO_4^{---}, CO_3^{--}, NO_3^{-}, K^{+}, Mg^{++}, Zn^{++}, suffisait le plus souvent à modifier le système lamellaire interne des chloroplastes des végétaux supérieurs, aussi bien que celui des Algues unicellulaires [11, 62, 106, 113, 125, 126, 215].

Parmi les divers composés qui, additionnés au milieu de culture ou appliqués directement sur les végétaux, sont susceptibles d'induire des chloroses, seuls la streptomycine, l'AAMT et l'AT, l'atrazine, le chloramphénicol et le 2-thiouracile, firent l'objet d'études quant aux modifications plastidiales accompagnant les troubles de la pigmentation.

Dans le cas de la streptomycine, les premiers auteurs, travaillant en microscopie photonique, aboutirent à des conclusions diverses. C'est ainsi que pour Von Euler [42] l'antibiotique inhibait

le développement des chloroplastes qui restaient à l'état de leucoplastes, tandis que pour Provasoli et coll. [**163**] les Euglènes, étaient « déplastées » par cette substance. Ventura et Perini, travaillant sur la Spirogyre, en 1953, se bornèrent à noter une décoloration des chromatophores après cinq jours d'action de l'antibiotique [**218**].

Au cours d'études poursuivies par nous-même en 1954 [**185**], il était alors établi que la streptomycine n'empêchait pas la formation des plastes, mais les altérait profondément. Elle était, d'autre part, sans action sur les plastes différenciés. Notre travail, à ce moment, ne semblait pas être parvenu, à la connaissance de De Deken-Grenson qui se bornait à signaler que l'on n'observait pas de plastes dans les feuilles d'Orge dépigmentées sous l'action de l'antibiotique [**27**].

Par contre, en 1960 [**28**], cet auteur signala la présence, grâce au microscope électronique, de leucoplastes dans les Euglènes blanchies et les figures qu'il décrivit, furent retrouvées par Siegesmund et coll. [**184**] sous le nom de « concentric lamellar bodies », par Lefort [**112**], ainsi que par Moriber et coll. [**135**]. Enfin, Rossner [**171**], nous-même [**189**], Döbel [**30**], Kirk et coll. [**102**] montrèrent que, chez les végétaux supérieurs, la streptomycine induisait des altérations des chloroplastes qui se manifestaient, au microscope électronique, par une absence de lamellisation interne dans les parties les plus dépigmentées. Rossner [**172**] précisa que, chez les Cyanophycées, cet antibiotique inhibait la formation des lamelles du chromatoplasma.

Quant aux travaux concernant l'action antichlorophyllienne d'autres substances sur les plastes, ils sont encore peu nombreux.

Le premier, nous avons montré [**187**] que l'AAMT provoquait des altérations irréversibles des chloroplastes se différenciant en sa présence, mais n'altérait pas ceux qui s'étaient différenciés avant son action. Ces observations furent ultérieurement confirmées par Linser et coll. [**121**], qui indiquèrent, d'autre part, que l'AT produisait des phénomènes analogues.

Poursuivant ensuite nos recherches, nous avons alors constaté, grâce à la microscopie électronique, que l'AAMT provoquait, comme la streptomycine, une altération importante de l'infrastructure des chloroplastes qui, dans les parties non pigmentées des feuilles, ne possédaient plus de système lamellaire interne [**188**]. Des résultats identiques furent ultérieurement obtenus par Döbel avec le chloramphénicol et le 2-thiouracile [**30**], tandis qu'Ashton et coll. [**6**] n'observèrent qu'une inhibition partielle de la lamellisation interne des chloroplastes sous l'action de l'atrazine.

3) *Modifications pathologiques.*

Pour terminer, signalons quelques travaux récents concernant des altérations plastidiales provoquées par des agents phytopathogènes. Matsui [**127**], Wehrmeyer [**220**] puis Gerola et coll. [**59**], décrivant les modifications de la structure lamellaire des chloroplastes de feuilles de Tabac infectées par le virus de la Mosaïque du Tabac, signalèrent, à l'inverse de ce que pensait Leyon [**118**], qu'il n'existe pas de relation entre le virus et les chloroplastes. D'autre part, Albertini et coll. [**3**] mirent en évidence dans les tumeurs provoquées chez *Datura* par *Agrobacterium tumefaciens*, ou des extraits de cette bactérie, des « chloroplastes à inclusion », qui coexistaient d'ailleurs avec des plastes à structure normale. De nouvelles études devront préciser la nature et la valeur de ces inclusions intraplastidiales inconnues. Ajoutons cependant, que ni dans le cas du Tabac virosé, ni dans celui des tumeurs, les altérations décrites ne se rapprochent de celles que l'on observe en présence d'antibiotiques, d'AAMT ou d'AT, le virus provoquant d'ailleurs plutôt une nécrose des cellules atteintes qu'une modification cytologique caractéristique.

En résumé, si l'on commence à bien connaître les modifications des structures plastidiales qui s'établissent sous l'action de divers facteurs, on doit cependant souligner qu'il n'existe que peu de travaux reliant les altérations de la pigmentation à celles de la structure et, d'une manière générale, les troubles de la structure à ceux de la fonction.

CHAPITRE III

ÉTUDE DES PIGMENTS DES PLASTES

Bien que l'étude de la structure chimique et de la biosynthèse des pigments des plastes ait, depuis longtemps, suscité un nombre considérable de recherches, ce n'est qu'au cours des deux dernières décades que nos connaissances dans ce domaine ont pu s'enrichir rapidement grâce, en particulier, aux perfectionnements apportés aux techniques de séparation des divers pigments et à l'utilisation de composés radioactifs.

Dans ce chapitre, nous mentionnerons simplement quelques-uns de ces progrès récents, et résumerons très succinctement, en particulier, les vues actuelles sur les étapes de la biosynthèse des pigments.

I. — SÉPARATION DES PIGMENTS FOLIAIRES

La séparation des pigments foliaires, longtemps obtenue par solubilité différentielle selon les techniques de Willstatter et Stoll [**225**], avait permis d'isoler, jusqu'en 1933, 15 caroténoïdes naturels. Le développement des techniques chromatographiques, 35 ans environ après la découverte du principe de cette méthode par Tswett en 1906 [**216, 217**], a permis, en quelques années, des progrès considérables. Dès 1948, en effet, on avait isolé 80 caroténoïdes naturels et l'on sépare aujourd'hui sans difficultés particulières les différents isomères d'un même caroténoïde. Actuellement, on emploie couramment, soit la chromatographie sur colonne, qui présente toutefois l'inconvénient de nécessiter une quantité relativement importante de matériel à analyser, soit la chromatographie sur papier, qui permet, par contre, des études qualitatives et quantitatives précises à partir de quantités très faibles d'un mélange de pigments. Il convient cependant de signaler que la chromatographie sur papier, dans ce domaine particulier, ne s'est développée que relativement tard, et ce n'est guère qu'à partir de 1952 que les physiologistes végétaux, tels que Bauer [**7**], Sironval [**191**] et Douin [**31**], s'intéressèrent à cette technique. Toutefois les méthodes préconisées par ces auteurs ne donnaient pas entière

satisfaction ; celle de Bauer n'aboutissait pas à une bonne séparation et, de plus, le solvant utilisé était mal défini, tandis que celle de Sironval, plus correcte, demandait un long développement ; enfin la méthode de Douin, nécessitant un contrôle de l'hydratation du papier, était assez délicate. C'est alors que nous avons été amené à mettre au point, en collaboration avec Lefort, une méthode rapide, utilisant des conditions expérimentales très simples [**114**]. Depuis d'autres modifications ont été apportées à la technique de chromatographie sur papier des pigments, certains utilisant des papiers imprégnés d'huile [**149**] ou d'adsorbants [**95**, **96**], d'autres pratiquant une séparation à deux dimensions à l'aide de deux solvants successifs. En fait, pour le problème qu'il nous intéressait de résoudre, les techniques postérieures à la nôtre, ne présentaient pas d'avantages très importants.

II. — HYPOTHÈSES ACTUELLES SUR LES ÉTAPES DE LA BIOSYNTHÈSE DES PIGMENTS

Il ne saurait être question d'envisager ici les diverses hypothèses successivement avancées par les biochimistes qui tentèrent d'élucider les chaînes de réactions aboutissant à l'édification des molécules de pigments. Nous nous bornerons à rapporter les schémas de synthèse proposés actuellement par les spécialistes de ces questions, en mentionnant la complexité de ces études dont beaucoup sont encore en cours actuellement.

A. Chlorophylles.

Une synthèse de l'ensemble des travaux les plus récents est résumé par le tableau I ci-dessous que l'on doit à Granick [**66**]. Ce schéma, qui ne résoud pas tous les problèmes, n'explique pas, en particulier, comment se constitue la chlorophylle *b* qui, pour certains [**195**], ne se formerait pas à partir de la chlorophylle *a*. Il faut toutefois signaler que, plus récemment, Sironval et coll. [**193**], ainsi que Duranton [**33**], étudiant, par des voies différentes, les dernières étapes de la biosynthèse des chlorophylles, parvinrent à la conclusion commune que le précuseur de la chlorophylle *b* est identique à celui de la chlorophylle *a*, et alors, de nature encore inconnue, ou qu'il est peut-être la chlorophylle *a* elle-même. Il semble donc que, si les premières étapes de la synthèse des chlorophylles sont maintenant bien connues, les stades ultimes devront encore être précisés.

B. Caroténoides.

Si l'utilisation de composés marqués a permis de connaître une partie de la chaîne de biosynthèse aboutissant à la formation

TABLEAU I

Principales étapes de la biosynthèse de la chlorophylle a d'après GRANICK [**66**].

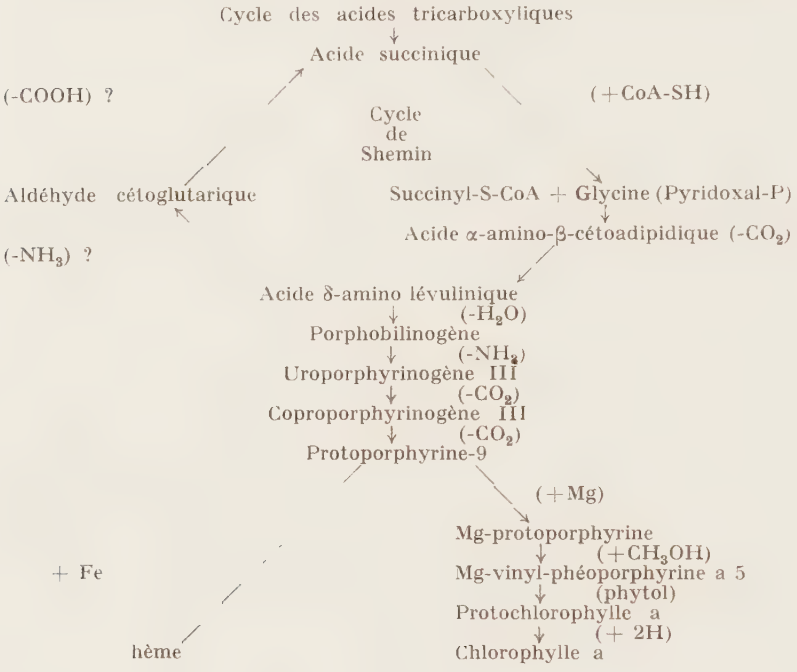
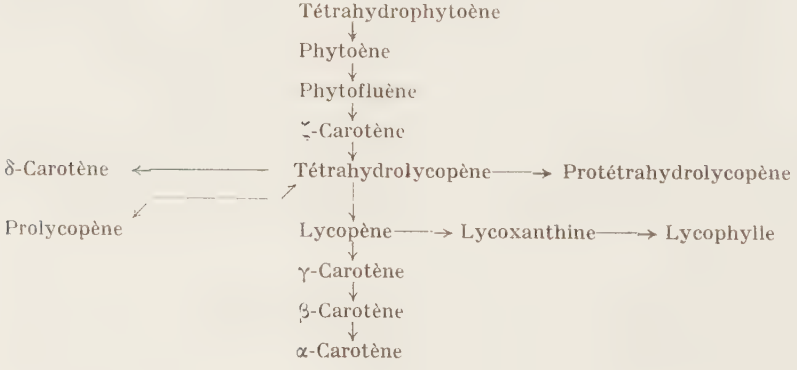


TABLEAU II

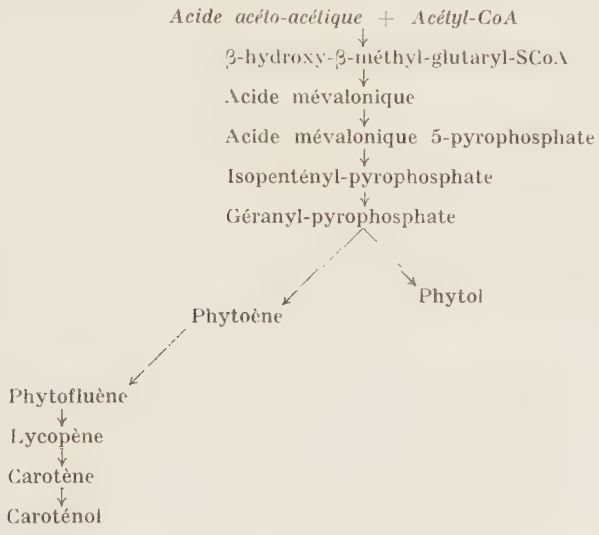
Dernières étapes de la formation des caroténoïdes d'après PORTER et LINCOLN [**156**].



de certains précurseurs des caroténoïdes, on n'a pas encore élucidé de manière certaine les dernières étapes de cette chaîne et, en particulier, comment, à partir de composés en C_{40}, sans double liaison, on passe aux différents caroténoïdes et xanthophylles. Les imprécisions qui subsistent encore sont telles que la littérature propose plusieurs schémas, insistant d'ailleurs sur des points différents de la chaîne. Parmi ceux-ci, il convient de rappeler les deux plus importants, que l'on doit à PORTER et LINCOLN [**156**] et à GRANICK [**66**] et qui sont reproduits dans les tableaux II et III :

TABLEAU III

Principales étapes de la synthèse des caroténoïdes d'après GRANICK [**66**].



Il est d'ailleurs probable que des voies latérales permettent d'aboutir à la formation d'un composé lorsqu'une inhibition intervient en un point donné de la chaîne normale. En résumé, il existerait, par endroits, plusieurs voies possibles de synthèse de certains intermédiaires.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Au cours de nos recherches nous avons fait appel à des techniques diverses. Certaines sont classiques, et nous ne les rappellerons que brièvement, alors que d'autres, plus particulières, seront décrites en détail.

Nous devons indiquer que le but essentiel de notre travail étant avant tout la recherche des modifications pigmentaires et cytologiques induites par diverses substances antichlorophylliennes, nous n'avons pas entrepris d'étude systématique et détaillée des troubles de la croissance que ces substances provoquent. Au cours de nos expériences, nous avons été amené, malgré tout, à chiffrer cette croissance. Dans ce cas, la moyenne de chaque condition a été établie en mesurant systématiquement 25 échantillons. De plus, afin de simplifier la présentation des résultats, nous avons toujours exprimé le développement en pourcentage par rapport aux témoins, en ne tenant pour valables que les différences atteignant au moins 10 %. Une étude statistique préalable nous a montré en effet qu'en prenant cette marge de sécurité nous ne risquions pas de commettre d'erreur d'interprétation.

Après avoir indiqué les conditions de culture des végétaux utilisés, nous préciserons le mode de traitement qui leur a été appliqué. Les techniques empruntées à la cytologie classique seront ensuite résumées, puis nous indiquerons celles de microscopie électronique. Enfin nous examinerons l'extraction, la séparation et le dosage des pigments plastidiaux.

CHAPITRE I

TECHNIQUES DE CULTURE ET DE TRAITEMENT DU MATÉRIEL BIOLOGIQUE

I. — TECHNIQUES DE CULTURE

Les diverses études que nous avons entreprises nous ont conduit à cultiver des plantules, des organes, ou des tissus. Les techniques employées sont différentes selon qu'il s'agit d'expériences de courte ou de longue durée, en milieu aseptique ou non.

Dans tous les cas, la température est maintenue entre 20 et 22° et les cultures sont éclairées pendant 14 heures par jour. L'intensité lumineuse varie selon les heures de la journée entre celle de la lumière solaire normale et un minimum de 2 000 lux fournis par des tubes fluorescents blancs et « Rose du soir ».

A. Culture de plantules.

Les plantules sont cultivées soit sur terre, soit sur milieu synthétique liquide ou solidifié par de la gélose.

Dans le cas des cultures sur terre, 15 graines sont semées par terrine de 15 × 25 cm ; les terrines sont ensuite maintenues en serre avec l'éclairage d'appoint.

En milieu liquide (solution de Knop additionnée de la solution d'oligoéléments de Berthelot à raison de 0,5 ml par litre) les graines sont disposées sur une toile métallique recouvrant un cristallisoir contenant le milieu nutritif. Ce milieu peut être facilement renouvelé ou remplacé en le siphonant. La croissance observée avec ce procédé est pratiquement identique à celle obtenue sur terre. Toutefois l'envahissement des racines des plantules par les champignons, surtout lorsqu'un antibiotique est incorporé au milieu de culture, nous a contraint à opérer aseptiquement. Nous utilisons encore dans ce cas le milieu de Knop, mais gélosé à 2 % et stérilisé avant addition de la substance à étudier. Les graines stérilisées par l'hypochlorite de calcium selon la technique de Gautheret [55], puis traitées ou non, sont d'abord mises à germer, sur du papier-filtre humide dans des boîtes de Pétri stériles, à l'étuve obscure à

22°. Trois à quatre jours plus tard, elles sont transférées dans les récipients de culture, en ayant soin de choisir des germinations aussi semblables que possible. Cette technique nous a permis de suivre, pendant plus de deux mois, le développement des plantules en expérience, alors que de nombreux auteurs [141, 142, 197] interrompirent leurs observations après 8 à 10 jours de culture.

B. Culture de tissus et d'organes.

Nous avons été amené à cultiver des tissus de Carotte et de Scorsonère, provenant de souches isolées par Gautheret, ainsi que des fragments de rhizome de Topinambour *(Helianthus tuberosus L.)*. D'autre part nous avons utilisé des cultures de prothalles de Fougères *(Gymnogramme calomelanos* Und.*)* et des gamétophytes de Sphaignes *(Sphagnum sp.)*. (Ces deux dernières souches nous ont été fournies par Mme Hurel à qui nous exprimons tous nos remerciements).

Les tissus de Carotte et de Scorsonère, les fragments de rhizome de Topinambour préalablement stérilisés selon la technique de Gautheret [55], sont cultivés sur le milieu nutritif habituel : Knop gélosé dilué de son volume d'eau distillée, additionné de solution de Berthelot modifiée par Gautheret, de glucose à la concentration de 3 %, et de doses variées, selon les tissus, de substances de croissance [55]. Dans certains cas, du lait de coco (20 % en volume) est ajouté à ce milieu.

Les prothalles de Fougères et les Sphaignes sont cultivées sur le milieu préconisé par Hurel [94] et qui comporte plus simplement du Knop au 1/2 gélosé, de la solution de Berthelot et du glucose à la concentration de 1 %.

C. Culture de microorganismes.

Les Algues flagellées étudiées *(Euglena gracilis* Pringsh. et *Chlamydomonas rheinhardii* P.A. Dangeard) (1) se développent dans

PO_4KH_2	0,10 g
PO_4K_2H	0,10 g
NO_3NH_4	0,30 g
$SO_4Mg, 7H_2O$	0,15 g
Cl_2Ca	0,04 g
citrate de Na	0,65 g
$Cl_3Fe, 6H_2O$	0,1 cm³
solution d'oligoéléments	10 cm³
acétate de Na	2 g
eau distillée	q.s.p. 1000 cm³

(1) Nous devons la souche d'*Euglena* à M. Lwoff et celle de *Chlamydomonas* à M. Rizet que nous remercions vivement.

un milieu dont la composition est indiquée ci-dessus, formé d'une solution minérale à laquelle on ajoute de l'acétate de Na comme aliment carboné.

II. — TRAITEMENT DU MATÉRIEL BIOLOGIQUE PAR DIVERSES SUBSTANCES

Nos recherches ont porté sur l'action exercée par des substances diverses sur des graines, des germinations, des plantules, des cultures de tissus et d'organes et des microorganismes, ce qui a nécessité des types de traitements assez différents, que nous examinerons rapidement.

Les graines sont, après stérilisation, mises à tremper à 22°, à l'obscurité, pendant un temps déterminé, dans des solutions de concentrations convenables du produit à étudier, le volume de la solution étant, en général, 10 fois plus grand que celui des graines. Après un court rinçage à l'eau ordinaire (pH 7,2-7,5), elles sont mises à germer, pendant des périodes variant, selon le matériel, entre 3 et 4 jours, à une température de 22°, dans une étuve obscure. Ce type de traitement donne de bons résultats, constants et reproductibles, alors qu'il n'en est pas de même lorsque l'on place des graines à germer dans une boîte de Pétri sur du papier imbibé de la substance à étudier. De ce fait, cette dernière technique n'a été utilisée que pour quelques essais préliminaires.

Aussi avons-nous recours plus généralement, lorsqu'il nous faut réaliser aseptiquement des expériences de longue durée, soit sur des graines, soit sur d'autres matériels, à une autre méthode qui consiste à incorporer le corps expérimenté au milieu de culture. Dans ce cas, la substance étudiée, préalablement stérilisée, n'est additionnée au milieu qu'après refroidissement de celui-ci à 45° environ, la solution nutritive complète étant ensuite répartie dans des récipients de culture eux-mêmes stérilisés.

Enfin, dans certains cas, nous traitons des plantules en pulvérisant sur les feuilles une solution du composé expérimenté additionné d'un mouillant à faible dose (généralement du Tween 80 à la concentration de 5 °/₀₀). Ce procédé, très commode, permet de traiter simultanément un grand nombre de plantules, mais il est difficile de préciser la quantité exacte de substance qui atteint chacune d'elles, et nous ne l'avons employé qu'assez rarement.

CHAPITRE II

TECHNIQUES CYTOLOGIQUES

La majeure partie de nos observations cytologiques a été effectuée au microscope photonique. Toutefois afin de préciser certaines d'entre elles, nous avons eu recours au microscope électronique. Nous résumerons ci-dessous les techniques couramment utilisées.

I. — ÉTUDES CYTOLOGIQUES AU MICROSCOPE PHOTONIQUE

Les nombreuses observations faites au microscope comportent toujours une étude sur le vivant avant fixation et coloration des échantillons.

A. Observations vitales.

Les observations vitales sont pratiquées sur des coupes à main levée, immergées aussitôt faites dans un liquide isotonique servant de milieu d'observation : Ringer pour des coupes de plantules, milieu de culture pour les colonies tissulaires ou les microorganismes.

Au microscope ordinaire, il suffit, le plus souvent, d'examiner les coupes sans coloration pour apprécier les modifications des chloroplastes ou du chondriome. Il est cependant nécessaire quelquefois d'avoir recours à des colorations vitales, notamment au Rouge neutre qui colore exclusivement la vacuole des cellules vivantes et au Vert Janus qui se fixe sur le chondriome. Dans ce cas, le pH des liquides de montage est ajusté à 7,2-7,5 par de la potasse [77].

Afin de mieux préciser nos observations, nous employons, en outre, d'autres techniques de microscopie. Si le microscope à contraste de phase se révèle souvent inutilisable en raison de l'épaisseur des coupes, le microscope à contraste interférentiel (système Nomarski), par contre, fournit des images d'une grande netteté. Enfin, un dispositif d'éclairage riche en lumière violette et ultraviolette, permet de localiser la chlorophylle, à l'intérieur des chloroplastes, grâce à sa fluorescence rouge vermillon.

B. Techniques de fixation, d'inclusion et de coloration

Nous utilisons essentiellement les techniques de la cytologie classique permettant la fixation et la coloration des plastes et du chondriome. Certaines d'entre elles conservent d'ailleurs la structure du noyau.

Les échantillons, dont l'épaisseur est de l'ordre du millimètre, sont fixés, sous vide, soit par le fixateur de Meves ou celui de Regaud (suivi de postchromisation) pour l'étude du chondriome et des plastes, soit par celui de Helly ou de Navashine lorsqu'on veut observer la structure nucléaire.

Les objets, inclus dans de la paraffine, sont ensuite débités en coupes dont l'épaisseur varie de 2 à 15 μ selon le matériel biologique fixé et le type d'observation à effectuer.

Le chondriome et les plastes sont colorés par l'hématoxyline de Regaud (après mordançage dans l'alun de fer) ou par la fuchsine acide d'Altmann selon la méthode de Gabe [**53**]. Les structures nucléaires sont mises en évidence grâce à l'hématoxyline de Regaud ou à la réaction nucléale de Feulgen.

C. Techniques cytochimiques.

Certaines substances sont caractérisées cytochimiquement à l'aide de réactions spécifiques ; c'est ainsi que l'amidon est mis en évidence par la réaction de Guilliermond [**74**] sur des coupes fixées au liquide de Regaud, et que les lipides sont révélés par une solution alcoolique saturée de noir Soudan après fixation au formol-calcium de Baker et coupes au microtome à congélation. Les tannins et dérivés flavoniques sont détectés grâce à la coloration brun-noir qu'ils donnent avec les sels ferriques ou brune avec le bichromate de potassium. Il est toutefois souvent délicat de distinguer les uns des autres ces deux types de composés phénoliques, et plusieurs réactions concordantes sont nécessaires pour obtenir une bonne caractérisation [**75**, **76**].

II. — ÉTUDES CYTOLOGIQUES AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE

Pour des raisons matérielles, il ne nous a été possible d'utiliser principalement qu'une technique de fixation et d'imprégnation que nous décrirons ci-dessous.

Les objets, de petite taille, dont une dimension doit être inférieure au millimètre, sont fixés sous vide partiel (50 mm de mercure) et à l'obscurité, soit à la température ambiante (20-22°) pendant 1 à 2 heures, soit à basse température (2-4°) pendant 12 heures environ, dans une solution d'acide osmique tamponnée à pH 7,2-

7,4 [**151**]. Les échantillons, rincés dans le tampon puis dans l'eau distillée, subissent ensuite la déshydratation.

Cette opération est réalisée de manière continue selon le dispositif préconisé par Bernhard [**9**] de telle sorte qu'elle soit achevée en deux heures. On élimine alors les régions périphériques, souvent mal fixées, des échantillons que l'on découpe en très petits fragments pour l'inclusion. Après passage dans deux bains d'alcool absolu pour parachever la déshydratation et dans des mélanges d'alcool et de méthacrylate de butyle, on procède à l'inclusion dans les capsules de gélatine contenant du méthacrylate de butyle additionné de catalyseur de polymérisation à 1 % (peroxyde de benzoyle préparé selon la technique de Charbonnier et Foucault [**20**]. La polymérisation s'effectue en 12 à 14 heures à 50°.

Les échantillons sont alors coupés à l'aide d'un microtome Servall Porter-Blum. Les coupes, recueillies sur des grilles recouvertes d'une pellicule de formvar, sont examinées sans élimination du méthacrylate.

CHAPITRE III

TECHNIQUES D'EXTRACTION, DE SÉPARATION ET DE DOSAGE DES PIGMENTS PLASTIDIAUX

Lorsque nous avons abordé l'étude des pigments plastidiaux, il n'existait pas, alors, de technique permettant l'analyse rapide et simultanée d'un grand nombre d'échantillons. Aussi avons-nous dû mettre au point une méthode qui réponde aux besoins de nos recherches [**114**].

Nous rapporterons ci-dessous les techniques utilisées pour extraire, séparer puis doser les pigments foliaires.

I. — EXTRACTION

Les tissus foliaires à analyser, pesés rapidement, congelés entre des pains de neige carbonique, sont broyés dans un mortier avec de la neige carbonique et une petite quantité de carbonate de magnésium pour éviter la transformation des chlorophylles en phéophytines. Lorsque le broyage est presque terminé, on ajoute quelques centimètres cubes d'acétone et on achève l'opération. La suspension ainsi obtenue est transférée sur un filtre de verre fritté. On percole ensuite le résidu solide par trois additions successives de petits volumes d'acétone. Dans ces conditions, l'extraction des chlorophylles est totale comme le montre un examen en lumière ultraviolette. Le volume d'extrait acétonique est alors ajusté dans une fiole jaugée qui est ensuite bouchée, puis placée immédiatement à basse température, à l'obscurité.

Ces extraits peuvent être utilisés, soit pour des dosages de pigments, soit pour des analyses chromatographiques.

Cette méthode présente plusieurs avantages. Elle est rapide car on peut, en une heure, extraire les pigments d'une dizaine d'échantillons différents. Elle est assez fine : nous utilisons en effet couramment des échantillons foliaires de pigmentation normale de 15 à 20 mg. De plus, elle est facilement reproductible et suffisamment précise, puisque les résultats obtenus au cours de dix dosages de la chlorophylle à extraire d'un même tissu, ne diffèrent pas les uns des autres de plus de 2 %.

II. — SÉPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE

Après avoir décrit, sous sa forme la plus simple, la méthode de séparation mise au point, nous mentionnerons quelques détails techniques s'y rapportant.

Nous opérons en chromatographie ascendante dans des grands tubes à essai de 32 cm de long et de 3,2 cm de diamètre. La chromatographie s'effectue sur du papier Whatmann n° 1, découpé en bandes de 2 × 26 cm. Ces bandes sont, avant l'emploi, lavées dans du solvant de formule identique à celui qui sert au développement du chromatogramme, puis séchées dans une étuve à 105° pendant 24 heures (fig. 1, A).

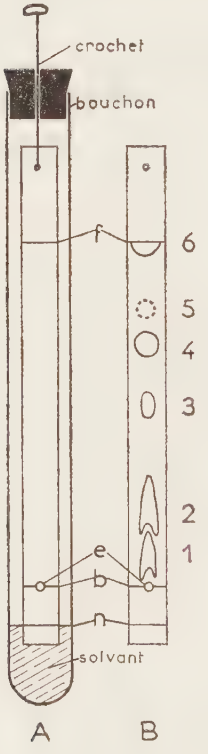


Fig. 1. — Dispositif utilisé pour l'analyse chromatographique qualitative rapide des pigments foliaires.

A : Dispositif au début du fonctionnement : le papier à chromatographie, fixé au crochet traversant le bouchon, plonge dans le solvant jusqu'au niveau (*n*). Sur la ligne de départ (*b*) on dépose l'échantillon (*e*), Le front de solvant s'élève en 50 minutes environ à 18 cm (*f*) de la base (*b*).

B : Chromatogramme obtenu par séparation des pigments contenus dans deux rondelles de feuilles d'Orge ou de Maïs de 3 mm de diamètre. Les diverses taches observées sont numérotées à partir de la base du chromatogramme.

L'échantillon à analyser est déposé vers la base du papier de telle sorte que la tache de départ soit située à 2 cm au-dessus du niveau qu'atteindra le solvant lors du début du développement du chromatogramme. Le moyen le plus simple et le plus rapide, inspiré de la technique préconisée par Sironval [**192**], consiste à écraser

sur le chromatogramme des rondelles de mésophylle de 3 mm de diamètre prélevées à l'emporte-pièce. Dans le cas de feuilles normalement pigmentées, deux rondelles (soit 1,5 à 2 mg de tissu foliaire) suffisent. On peut également déposer une certaine quantité d'extrait acétonique sur la ligne de départ.

On verse, dans le tube, 10 cm³ de solvant constitué d'un mélange d'éther de pétrole léger (point d'ébullition 38-42°), d'acétone et de benzène dans les proportions respectives de 8,5-1-0,5 en volume, puis on fixe la bande de papier au crochet traversant le bouchon obturant le tube, de manière à ce que 1 cm environ de la base plonge dans le solvant. En opérant à la température ambiante (20°), on constate que, 50 à 60 minutes plus tard, le front du solvant a parcouru environ 20 cm et que l'on peut très facilement observer, à partir de feuilles de plantules normales d'Orge ou de Maïs, les six taches suivantes en lumière blanche ou en lumière ultraviolette (fig. 1, B).

1. Rf : 0,2 vert-olive
2. Rf : 0,4 bleu-vert
3. Re : 0,55 jaune pâle
4. Rf : 0,7 jaune d'or
5. Rf : 0,8 verdâtre peu visible en lumière blanche mais fluorescent rouge en U.V.
6. Rf : 0,95 jaune orangé

Cette méthode permet donc de réaliser très rapidement, dans des conditions expérimentales très simples, avec très peu de matériel, une bonne séparation des principaux pigments foliaires. Il est possible d'obtenir en deux heures de quinze à vingt analyses chromatographiques.

La méthode est très souple car il est possible d'opérer dans n'importe quel récipient. Toutefois il importe que la composition du solvant ne varie pas. Pour cela il est nécessaire que le récipient soit fermé et contienne, pour saturer l'atmosphère, un volume suffisant de ce solvant (3 % environ). L'emploi de récipients volumineux est d'ailleurs particulièrement indiqué lorsqu'on doit effectuer la chromatographie d'une quantité relativement importante de pigments, ce qui implique naturellement une augmentation corrélative de la surface des chromatogrammes.

D'autre part, il convient de remarquer que la qualité des séparations, bien qu'excellente dans le cas d'écrasement de rondelles de mésophylle est encore fort améliorée par l'emploi d'un extrait acétonique. Dans ce dernier cas, la séparation est en effet plus précise et les résultats deviennent encore meilleurs si les pigments sont, préalablement à leur séparation, transférés de l'acétone dans l'éther de pétrole. L'acétone est éliminée par lavage et la solution de pigments dans l'éther doit être utilisée rapidement

sinon les chlorophylles, peu solubles, précipitent. Une telle technique, avec transfert, est en général employée lorsqu'il s'agit d'effectuer une analyse quantitative précise.

Enfin, il est recommandé de travailler à la température de 20-22°, car des températures plus élevées ou plus basses ralentissent considérablement la vitesse du développement des chromatogrammes. Un abaissement de la température à 4° ou une élévation à 32° multiplient en effet par six et par trois, respectivement, le temps nécessaire pour un développement correct. Quant à l'éther de pétrole, celui que nous préconisons, à point d'ébullition compris entre 38 et 42°, permet de réaliser une séparation meilleure et plus rapide que les fractions lourdes obtenues à 70-80°.

Mentionnons enfin que les taches 1, 2 et 5 sont facilement éluées par l'éther éthylique ; les pigments des taches 3 et 4 le sont par l'alcool éthylique, et que l'éther de pétrole extrait la tache 6.

III. — DOSAGE DES PIGMENTS

Les pigments peuvent évidemment être dosés après séparation chromatographique et élution, mais cette méthode très précise exige de longues manipulations incompatibles avec le nombre d'analyses que nous devions effectuer en un laps de temps donné. Aussi ne l'avons-nous que rarement utilisée.

Plusieurs méthodes permettent de doser, sans séparation chromatographique, les principaux pigments foliaires. C'est ainsi que Seybold et Eagle [**183**] et Takashima [**213**] préconisent une transformation des chlorophylles en phéophytine que l'on dose ensuite, que Comar et Zscheile [**21**] déterminent directement la teneur en chlorophylle d'un extrait acétonique transféré dans l'éther, alors que Mackinney [**124**] utilise directement un extrait acétonique. Toutes ces méthodes nécessitant un certain nombre de manipulations, nous leur avons préféré la technique de Holm [**92**] et Nybom [**150**], très simple et très rapide. Partant d'un extrait de pigments dans l'acétone anhydre, elle permet d'obtenir, par simple lecture au spectrophotomètre, à trois longueurs d'onde différentes (662 mμ, 644 mμ et 440,5 mμ), les teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes totaux de l'échantillon considéré.

Ces concentrations, exprimées en μg par gramme de poids frais, sont données par les formules suivantes :

$$C_a = (9{,}78\ E_{662} - 0{,}99\ E_{644})\frac{V}{P}$$

$$C_b = (21{,}42\ E_{644} - 4{,}65\ E_{662})\frac{V}{P}$$

$$C_c = (4{,}69\ E_{440{,}5} - 5{,}47\ E_{644} - 1{,}37\ E_{662})\frac{V}{P}$$

où C_a, C_b, C_c, représentent respectivement les concentrations en chlorophylle *a*, chlorophylle *b*, et caroténoïdes totaux ; E_{662}, E_{644}, $E_{440,5}$, les extinctions de l'extrait de pigments à doser, mesurées au spectrophotomètre aux trois longueurs d'onde considérées ; P, le poids frais de l'échantillon exprimé en grammes, et, enfin, V, le volume de l'extrait en ml.

Il est possible, avec cette méthode, de doser quantitativement, par exemple, les variations de la pigmentation foliaire le long des trois feuilles d'une plantule de Maïs âgée de 15 jours, en moins de trois heures, ce qui représente 25 extractions différentes des pigments, et leur mesure au spectrophotomètre.

Avant de terminer ce chapitre, il est nécessaire de mentionner que toutes les manipulations des extraits pigmentaires se font rapidement, autant que possible à basse température, et toujours à l'obscurité, ou en lumière très atténuée, afin d'éviter au maximum toute destruction des pigments.

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I

MODIFICATIONS DE LA CROISSANCE ET DE LA PIGMENTATION DE PLANTULES, D'ORGANES OU DE TISSUS DIVERS, SOUS L'ACTION DE DIFFÉRENTS ANTIBIOTIQUES OU COMPOSÉS ANTICHLOROPHYLLIENS

Nos recherches ont porté, d'une part, sur les modifications induites par la streptomycine chez divers végétaux supérieurs et inférieurs, et d'autre part, sur celles provoquées chez quelques végétaux par diverses substances antibiotiques ou antichlorophylliennes. Sans chercher à entreprendre une étude systématique et chiffrée de la croissance, ce qui a déjà été fait par de très nombreux chercheurs, nous avons, au cours des expériences décrites ci-dessous, noté les variations de la croissance, les modifications morphologiques et les altérations pigmentaires.

I. — MODIFICATIONS PROVOQUÉES PAR LA STREPTOMYCINE (SM) ET LA DIHYDROSTREPTOMYCINE (DSM)

L'action de ces antibiotiques sera étudiée d'abord sur les végétaux supérieurs, puis sur les végétaux inférieurs. Dans un premier temps, nous avons observé que les modifications induites par la streptomycine (SM) étaient rigoureusement identiques à celles provoquées par la dihydrostreptomycine (DSM). Aussi l'ensemble des observations rapportées ci-dessous concernent-elles également ces deux substances, bien que les schémas et graphiques présentés ici aient tous été obtenus en faisant agir la DSM, beaucoup plus

stable que la SM. Dans tous les cas, les concentrations indiquées se rapportent à la quantité de DSM-base utilisée.

A. Végétaux supérieurs.

Nos recherches ont été effectuées soit sur des plantules entières, soit sur des cultures de tissus végétaux.

1) *Végétaux entiers.*

Deux monocotylédones, l'Orge (*Hordeum vulgare* L. var. Aurore) et la Maïs (*Zea mays* L., hybride Wisconsin 255) ainsi qu'une dicotylédone, le Pois (*Pisum sativum* L. var. Annonay), ont été utilisées au cours de nos expériences. Nous examinerons successivement les résultats obtenus avec chacune de ces plantes.

a. Orge.

Nos premières expériences, effectuées avec des concentrations en antibiotiques identiques à celles utilisées par Von Euler en 1917, mais dans des conditions expérimentales plus rigoureuses, nous ont permis de préciser les observations de cet auteur.

Des graines d'Orge stérilisées sont trempées pendant 24 heures, soit dans de l'eau distillée (plantules témoins), soit dans des solutions de DSM à la concentration de 10^{-3}. On les transporte ensuite aseptiquement, après germination, soit, en général, quatre jours après la fin du traitement, dans des tubes contenant du liquide de Knop solidifié par de la gélose, et les cultures sont alors exposées à la lumière.

Après 25 jours, la taille moyenne des plantules traitées (13,7 cm) est inférieure de 35 % environ à celle des témoins (21,1 cm). Elles présentent un coléoptile plus gros et plus court et une première feuille possédant, entre une pointe verte et une base incolore, une zone de transition dont la pigmentation varie du vert au blanc ; la deuxième feuille est entièrement blanche, alors que, chez la troisième, la base du limbe est légèrement verte. La pointe de la quatrième feuille formée est vert-pâle, tandis que le reste du limbe est normalement pigmenté. Les cinquième et sixième feuilles, apparues après 45 jours de culture, sont entièrement vertes. Il faut d'autre part noter que les racines, courtes, souvent épaissies, sont recourbées « en serres » à l'extrémité (fig. 2).

La DSM produit donc, dans ces conditions, un ralentissement de la croissance accompagné d'une altération de la pigmentation des premières feuilles apparues. Cette altération, qui ne s'étend pas à toute la plante, semble de plus irréversible, car les régions dépigmentées sont incapables d'élaborer ultérieurement de la chlorophylle, quelle que soit la durée de la culture.

Afin de préciser quelle pourrait être, dans des conditions expérimentales identiques, l'influence de diverses concentrations en DSM, nous avons soumis des graines à des doses d'antibiotiques comprises entre 10^{-7} et 10^{-2}.

Fig. 2. — Plantules d'Orge âgées de 30 jours issues de graines traitées ou non par la DSM à la concentration de 10^{-3}.
0 : plantule témoin. — 10^{-3} : plantule provenant de graines traitées par 10^{-3} de DSM pendant 24 h. Les feuilles, dans les deux cas, sont numérotées d'après leur ordre d'apparition au cours du développement des plantules. — C : coléoptile. — R : racines.

Les observations concernant la taille et la pigmentation des plantules, 30 jours après le début du traitement, sont résumées dans la figure 3.

L'examen de cette figure permet de constater que les faibles concentrations, jusqu'à 10^{-5}, ne troublent pas la croissance des plantules. On note même une très légère stimulation, bien que statistiquement non significative, pour la concentration de 10^{-5} ; par contre, les fortes doses, supérieures à 5.10^{-3}, provoquent une inhibition presque totale de la croissance. On remarque, d'autre part, que ce n'est qu'à partir de 5.10^{-4} que se manifestent les premières altérations de la pigmentation. Parallèlement, le système radiculaire est altéré, et, de 10^{-4} à 10^{-2}, on constate que la taille et le nombre des racines diminuent progressivement.

En résumé, le seuil d'action de la DSM sur la croissance se situe, dans les conditions expérimentales que nous avons employées, à la concentration de 10^{-4}, tandis que celui sur la pigmentation n'est atteint qu'à 5.10^{-4}. D'autre part, les fortes doses, supérieures à 5.10^{-3}, sont très toxiques pour les plantules et inhibent presque totalement la croissance en même temps que la pigmentation.

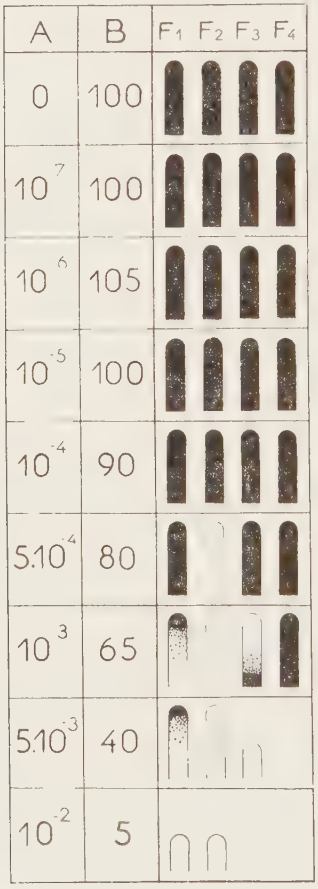


Fig. 3. — Croissance et pigmentation de plantules d'Orge âgées de 30 jours, provenant de graines traitées, pendant 24 h, par diverses doses de DSM.
A : concentrations de DSM employées. — B : croissance des plantules exprimées en % des témoins. — F_1, F_2, F_3, F_4 : feuilles des plantules numérotées selon leur ordre d'apparition.
Pour simplifier le diagramme, les différences de longueur des diverses feuilles développées ne sont pas indiquées, sauf dans le cas d'ébauches foliaires en cours d'élongation. L'intensité et la répartition de la pigmentation sont figurées par une teinte plus ou moins foncée.

Dans une autre série d'expériences, nous avons alors envisagé l'influence de la durée du trempage des graines dans une solution de l'antibiotique sur les plantules issues de ces graines. Pour cela nous avons employé de la DSM à la concentration de 10^{-3} qui provoque des réactions caractéristiques sans être trop toxique.

Des lots de graines identiques, 50 par condition, sont donc

immergées soit dans de l'eau distillée, soit dans de la DSM (10^{-3}) pendant des temps variant de 1/2 heure à 72 heures, puis mises à germer comme précédemment et, après repiquage dans des tubes de culture, exposées à la lumière. On note, 25 jours après, le nombre de plantules présentant les réactions caractéristiques décrites ci-dessus.

TABLEAU IV

Nombre de plantules présentant des troubles de la croissance et de la pigmentation provenant de lots de 50 graines immergées pendant des durées variables dans une solution de DSM à la concentration de 10^{-3}.

Temps de trempage dans la DSM (10^{-3}) (en heures)	1/2	1	3	6	12	24	48	72
Nombre de plantules présentant des altérations caractéristiques de croissance et de pigmentation	0	0	0	4	46	50	50	50

Le tableau IV résume les observations effectuées ; on y remarque qu'après 6 heures d'action, la DSM n'affecte qu'environ 10 % des graines, alors qu'après 12 heures, la presque totalité des plantules est atteinte.

Il faut signaler, en outre, qu'après 72 heures de trempage, les plantules issues de ces graines présentent quelquefois des anomalies de la croissance. C'est ainsi que le bourgeon principal donne parfois naissance à deux feuilles dont la pigmentation est altérée, puis cessant de fonctionner, il est remplacé par deux ou trois bourgeons latéraux, l'un d'eux étant souvent plus développé que les autres. Dans ce cas, la première feuille des rejets formés est généralement blanche, tandis que les suivantes sont vertes, et que, d'autre part, de nombreuses racines se développent alors.

Il faut donc, en résumé, tremper les graines pendant au moins 12 heures dans la DSM à la concentration de 10^{-3} pour obtenir au moins 90 % de plantules présentant des modifications pigmentaires caractéristiques.

Nous avons enfin tenté, dans une dernière série d'expériences, d'étudier les modalités d'action de la DSM intervenant à différents moments du développement des plantules.

Deux lots de 200 graines stérilisées sont immergés pendant 24 heures l'un dans de l'eau distillée, l'autre dans une solution de DSM à la concentration de 10^{-3}. Chaque lot est alors divisé en deux parties : l'une est mise à germer pendant 70 heures à l'étuve obscure à 22° dans des boîtes de Pétri contenant du papier-filtre imbibé d'eau distillée, tandis que l'autre est traitée dans les mêmes condi-

tions par de la DSM à la concentration de 10^{-3}. Les germinations ainsi obtenues sont repiquées dans des tubes contenant du liquide de Knop, solidifié par de la gélose et additionné ou non de DSM à la même concentration que ci-dessus, puis placées à la lumière.

Les différentes conditions réalisées ainsi sont résumées dans le tableau V :

TABLEAU V

Conditions de traitement de plantules d'Orge par la DSM, à la concentration de 10^{-3}, intervenant à divers moments de leur développement.

Séries	Moment et durée du traitement		
	avant germination (24 heures)	pendant germination (72 heures)	après germination (continue)
1	eau	eau	Knop
2	DSM	eau	Knop
3	eau	DSM	Knop
4	eau	eau	Knop + DSM
5	DSM	DSM	Knop
6	eau	DSM	Knop + DSM
7	DSM	DSM	Knop + DSM

La taille des plantules est mesurée 4, 7, 14 et 23 jours après le repiquage et l'on apprécie l'intensité et la répartition de la pigmentation dans les feuilles. Les résultats de ces observations sont résumés dans la figure 4 dont l'examen permet de tirer les conclusions suivantes :

Un seul traitement réalisé à un moment quelconque, avant, pendant ou après la germination, provoque un ralentissement de la croissance. Ce ralentissement s'installe d'une manière définitive et d'autant plus précoce que l'antibiotique est appliqué plus tôt (cf. séries 2, 3, 4). Les feuilles qui se forment pendant l'application de la DSM sont, en outre, dépourvues de chlorophylle. Ce trouble de la pigmentation est immédiat si l'on opère par trempage des graines (série 2), tandis qu'il n'apparaît que graduellement si l'on traite des plantules (séries 3 et 4). Ultérieurement des nouvelles feuilles chlorophylliennes peuvent se développer, mais les feuilles incolores ne reverdissent jamais.

Si l'on réalise deux traitements successifs (séries 5 et 6), l'inhibition de la croissance est plus forte que précédemment ; quant à celle de la pigmentation, elle est immédiate si le premier traitement est précoce, et seulement graduelle s'il est réalisé tardivement.

Enfin un traitement continu inhibe presque totalement la croissance et la pigmentation.

Mentionnons, ici encore, quelques anomalies de croissance, notamment dans la série 5, analogues à celles que nous avons observées au cours de l'expérience précédente, après des temps de trempage prolongés. Ces anomalies concernent le bourgeon principal des plantules qui, inhibé après l'apparition de la deuxième feuille, est remplacé par deux ou trois pousses secondaires dont les der-

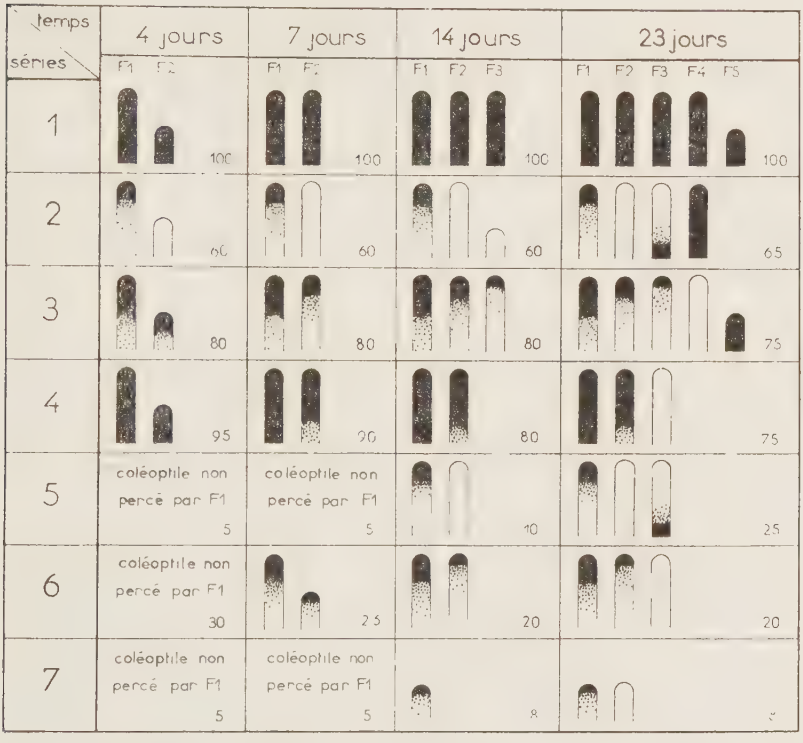


Fig. 4. — Action de la DSM à la concentration de 10^{-3} sur la croissance et la pigmentation de plantules d'Orge.

On fait agir l'antibiotique sur des graines ou des plantules parvenues à divers degrés de développement (F_1, F_2, etc., représentent les feuilles des plantules observées numérotées d'après leur ordre d'apparition). Les chiffres portés à droite dans chaque case expriment en % la croissance par rapport aux témoins. Pour simplifier, on a négligé d'indiquer les différences de longueur des diverses feuilles ayant terminé leur élongation, sauf dans le cas d'ébauches foliaires à peine visibles au moment des observations. L'intensité et la répartition de la pigmentation sont représentées par une teinte plus ou moins foncée.

nières feuilles peuvent être normalement pigmentées. La formation de nombreuses racines secondaires adventives est liée à cette modification.

On voit donc que les traitements précoces sont les plus efficaces. Ce fait s'explique facilement car, dans ce cas, la DSM agit directement, en traversant le tégument de la graine, sur le point végétatif de la jeune plantule, tandis que, dans les autres traitements, l'antibiotique doit y être transporté après absorption par les racines. L'efficacité des traitements précoces concerne aussi bien l'inhibition de la croissance que la suppression de la pigmentation. Il n'existe toutefois pas de relation directe entre les deux phénomènes. Ces expériences confirment, de plus, le fait qu'une feuille incolore est incapable de synthétiser des pigments ultérieurement.

En conclusion, nous pouvons dire que, chez l'Orge, la DSM provoque des modifications de croissance et de pigmentation qui ne semblent pas liées. A condition que sa concentration ne soit pas trop élevée, la DSM induit des troubles irréversibles de la pigmentation qui n'intéressent que les feuilles qui se forment au moment où elle agit. La pigmentation des feuilles formées antérieurement et postérieurement à son action n'est pas altérée.

b. Maïs.

Afin de disposer d'un matériel biologique possédant des feuilles plus grandes, permettant une étude plus facile des pigments foliaires et de leurs modifications sous l'action de la DSM, nous avons refait, sur le Maïs, quelques-unes des expériences effectuées sur l'Orge. Nous n'en mentionnerons ici que l'essentiel, les résultats étant sensiblement les mêmes dans l'un et l'autre matériel.

Traitées pendant 24 heures par une solution de DSM à la concentration de 10^{-3}, des graines de Maïs donnent des plantules qui, cultivées à la lumière, présentent, 29 jours après la fin du traitement, une croissance de 40 % inférieure à la normale, dont la racine principale n'est pas ramifiée, et qui ne possèdent pas de racines adventives (fig. 5). Le coléoptile, plus court, est très riche en anthocyanes ; la première feuille présente une pointe vert pâle ou jaune et la base blanche, la deuxième et la troisième feuille sont blanches, alors que la quatrième présente souvent une base verte. La cinquième et la sixième feuille sont tout à fait normales.

D'autre part, si l'on fait agir différentes concentrations de DSM (10^{-7} à 10^{-2}) sur le Maïs, on note que la taille des plantules décroît très rapidement à partir de 10^{-4}, et que l'on aboutit à une inhibition quasi-totale à 10^{-2}. Les premiers troubles pigmentaires se manifestent à 3.10^{-4} ; ils sont très importants dès 5.10^{-4} et la dépigmentation des plantules est complète à 10^{-2}.

Enfin si la DSM agit à la concentration de 10^{-3} à différents moments du développement des germinations, on constate, là encore, que l'antibiotique altère la pigmentation des seules feuilles qui se forment en sa présence tandis que celles qui sont apparues

avant, ou qui se différencient après son action, ont une teinte normale.

Si l'on excepte l'intense formation d'anthocyanes manifestée par le Maïs en présence de l'antibiotique, on peut considérer que les réactions de ce matériel sont très voisines de celles de l'Orge ; de plus, la sensibilité à l'action de la DSM est presque la même dans les deux cas, qu'il s'agisse de croissance ou de pigmentation.

Fig. 5. — Plantules de Maïs âgées de 30 jours provenant de graines traitées ou non par la DSM à la concentration de 10^{-3}.
O : plantule témoin. — 10^{-3} : plantule issue de graine traitée par 10^{-3} de DSM pendant 24 heures.
Dans les deux cas, les feuilles sont numérotées d'après l'ordre de leur apparition au cours du développement des plantules.
C : coléoptile. — Ra : racines adventives. — Rp : racine principale.

c. Pois.

Dans une première expérience, effectuée dans des conditions identiques à celles utilisées pour l'Orge et le Maïs, nous avons traité des graines de Pois par des concentrations de DSM échelonnées de 10^{-7} à 10^{-2}.

Vingt-cinq jours après le transfert des plantules dans les tubes de culture, les plantules étant alors âgées de 30 jours, on constate que les faibles concentrations (10^{-7} à 10^{-5}) sont sans action sur le Pois. Par contre, à partir de 10^{-4}, si la croissance n'est pas altérée, des troubles de la morphogenèse apparaissent alors, caractérisés par un abaissement du niveau de formation des racines secondaires

à partir du point d'insertion des cotylédons. Cet abaissement peut atteindre jusqu'à 1 cm (fig. 6). A 5.10^{-4}, en même temps que l'on constate une réduction de la croissance, qui n'atteint plus que 80 % de celle des témoins, les troubles de la rhizogenèse s'accentuent. Ces modifications s'accompagnent des premiers troubles de la pigmentation qui se traduisent par une décoloration de la base de la tige ainsi que de celle des première et deuxième feuilles, alors que la troisième feuille prend un aspect panaché. Ces altérations s'accentuent à 10^{-3}, où la croissance n'est plus que de 60 % par rapport au

Fig. 6. — Plantules de Pois âgées de 30 jours et provenant de graines traitées pendant 24 heures par diverses concentrations de DSM.
Les feuilles sont numérotées selon leur ordre d'apparition au cours du développement des plantules.
O : plantule témoin. — 10^{-4}, 5.10^{-4}, etc... : plantules provenant de graines traitées pendant 24 heures par des solutions de DSM à la concentration indiquée.

témoin. Pour cette concentration, de plus, la racine, non ramifiée, s'est considérablement épaissie et un blanchiment total ou partiel affecte maintenant les cinq premières feuilles. Enfin les très fortes doses (10^{-2}) bloquent presque complètement la croissance, troublent profondément la morphogenèse et inhibent toute la pigmentation.

Il faut noter une certaine hétérogénéité dans le lot de plantules provenant de graines traitées par la DSM à la concentration de 5.10^{-3}. Il arrive, par exemple, que, sur quelques-unes d'entre elles, un bourgeon axillaire ou cotylédonaire, chlorophyllien, reprenne

sa croissance, alors que le développement de l'apex, dépigmenté, reste bloqué. Dans ce cas, on observe une reprise de l'allongement de la racine principale qui reste toutefois incapable de se ramifier.

Comme chez l'Orge et le Maïs, enfin, on constate que les feuilles dépigmentées ne peuvent reverdir, alors que toutes les nouvelles feuilles apparues après un mois de culture sont toujours normalement pigmentées.

En résumé, dans les conditions que nous venons d'indiquer, la DSM agit sur la croissance et la pigmentation du Pois, comme sur celle de l'Orge et du Maïs, mais son action sur la morphogenèse de la plantule, et, plus particulièrement, sur le système radiculaire, est plus marquée chez la Dicotylédone.

Si l'on fait agir ensuite une solution de DSM à la concentration de 10^{-3} sur des graines de Pois, pendant des durées variant de 1/2 heure à 70 heures, toutes les autres conditions étant identiques à celles décrites dans la première expérience, on remarque que l'on observe déjà quelques réactions, aussi bien morphologiques que pigmentaires, dans le lot n'ayant subi qu'une heure de traitement. Le nombre de ces réactions croît avec le temps de trempage, et il faut 24 heures d'immersion dans la solution d'antibiotique pour que la totalité des plantules présentent des symptômes sensiblement identiques. Des trempages supérieurs à 24 heures, par contre, ne provoquent plus de variations notables.

D'une manière générale, le Pois est donc relativement sensible à l'action de la DSM. Les variations individuelles que l'on observe, atténuées ou annihilées par de longues périodes de trempage des graines, sont probablement dues à des différences de perméabilité des téguments.

Enfin, si l'on introduit de la DSM à la concentration de 10^{-3}, avant, pendant, ou après la germination, on constate encore que la pigmentation des organes différenciés avant ou après son action n'est pas modifiée. Seuls, ceux formés en présence de DSM sont blancs et restent incapables de reverdir.

En résumé, la DSM agit sur la pigmentation du Pois comme elle le fait sur celle de l'Orge et du Maïs ; d'autre part, elle provoque, chez cette plante, des troubles de la croissance et de la morphogenèse affectant, d'une manière particulièrement nette, le système radiculaire.

d. Résumé et conclusions.

Nous avons donc pu constater, au cours des expériences que nous venons de rapporter, que la DSM avait, sur l'Orge, le Maïs et le Pois, une action s'exerçant à la fois sur la croissance et sur la pigmentation, à condition toutefois que l'antibiotique agisse au-dessus d'une certaine concentration, et au-delà d'un temps minimum. Cependant les concentrations seuils sont légèrement diffé-

rentes pour les deux types de phénomènes, la croissance étant plus sensible, d'une manière générale, que la pigmentation.

C'est ainsi que, pour déclencher des troubles de la croissance et de la morphogenèse, les minimums de temps et de concentration sont sensiblement identiques pour les trois graines utilisées et se situent aux environs de la concentration de 10^{-4}, agissant pendant 24 heures. D'autre part, une concentration minimum de 3.10^{-4} de DSM pour le Maïs et de 5.10^{-4} pour l'Orge et le Pois, sont nécessaires pour que l'on puisse observer, sur les plantules provenant de graines traitées pendant 24 heures, un début d'altération pigmentaire.

Si l'on se place dans ces conditions limites de concentrations et de durée d'action, on observe souvent des variations individuelles de réactions des plantules. Elles sont particulièrement importantes avec le Pois si l'on diminue le temps d'action, et si l'on augmente simultanément la concentration en antibiotique. Il semble que ces variations doivent être attribuées à des différences individuelles de perméabilité des graines traitées vis-à-vis de l'antibiotique.

Signalons, enfin, qu'il ne paraît pas exister de relation directe entre les altérations de la pigmentation et celles de la croissance et de la morphogenèse, car ces dernières ont pu être observées aussi bien sur des plantules cultivées à l'obscurité qu'à la lumière.

2) *Cultures de tissus.*

Afin de préciser l'action de la DSM, nous nous sommes adressé à des cultures de tissus en utilisant, soit une souche bien établie de tissus de Carotte, soit des fragments de rhizome de Topinambour.

a. Tissus de Carotte.

Nous avons utilisé la souche de Carotte isolée par Gautheret en 1937. Cette souche très chlorophyllienne à la lumière est cultivée sur le milieu de base préconisé par cet auteur [**55**], additionné de vitamine B_1 (10^{-6}) et d'acide β indole acétique (10^{-7}), auquel on ajoute la DSM à des concentrations variant entre 10^{-8} et 5.10^{-3}. Les cultures, exposées à la lumière, sont examinées six semaines après l'ensemencement.

On constate que les concentrations d'antibiotique inférieures à 10^{-6} sont sans action sur les tissus. Par contre, dès 10^{-6} la croissance, exprimée en poids frais, diminue d'environ 25 % par rapport aux témoins, sans que l'on observe d'altérations pigmentaires. A 10^{-5}, concentration à laquelle l'antibiotique présente déjà une toxicité fort importante, la croissance des colonies tissulaires, qui ont pris par ailleurs une teinte jaunâtre, n'est plus guère que de 20 % de celle des témoins. Si la concentration augmente encore, ces phénomènes s'accentuent et les explantats se nécrosent.

Afin de déterminer si les lésions provoquées par la DSM entraînent une incapacité de développement ultérieur des cultures, nous

avons repiqué les divers explantats ayant servi à l'expérience précédente sur milieu de base sans DSM, additionné ou non de 20 % de son volume de lait de coco. On sait, en effet, que ce produit naturel est susceptible de stimuler activement la prolifération cellulaire, et nous espérions que, si la DSM engendrait des déficiences métaboliques, le lait de coco pourrait éventuellement les compenser par son apport de facteurs complexes.

En fait, l'expérience a montré que ces facteurs complexes ne permettaient pas de pallier les troubles induits par l'antibiotique. En effet, les résultats ont été identiques, que les milieux aient été additionnés ou non de lait de coco et quelle que soit la concentration de l'antibiotique lors du traitement initial.

C'est ainsi que les explantats préalablement soumis à une concentration de DSM de 10^{-6}, présentent une croissance et une pigmentation normale alors que ceux qui avaient été soumis à la concentration de 10^{-5}, donnent des cultures normalement vertes mais à développement lent, et n'atteignant, après 6 semaines, que 50 %, en poids frais, des précédentes. Enfin, les explantats traités par des doses supérieures à 10^{-5}, se sont révélés incapables de se multiplier et sont morts.

La DSM se montre donc très toxique pour la souche de tissus de Carotte, puisque son action inhibitrice s'exerce déjà sur la croissance dès la concentration de 10^{-6}.

b. Ensemencement primaire de rhizome de Topinambour.

Les fragments de rhizome de Topinambour sont cultivés sur le milieu de base préconisé par Gautheret, additionné de vitamine B_1 (10^{-6}) et d'acide α naphtalène acétique à la concentration de 10^{-7}, auquel on ajoute ou non de la DSM à des doses variant de 10^{-6} à 10^{-3}.

Après six semaines de croissance à la lumière, on constate que les explantats cultivés en présence des concentrations les plus faibles d'antibiotique (10^{-6}, 10^{-5}) sont identiques aux témoins. Par contre, la concentration de 10^{-4}, si elle ne semble pas agir sur leur croissance, provoque une altération de leur pigmentation ; celle-ci n'a toutefois qu'un caractère local, car, tandis que la partie immergée dans le milieu n'est colorée qu'en vert très pâle, les régions émergées sont normalement pigmentées. A 5.10^{-4}, la croissance se ralentit et l'on ne décèle plus, en dehors du milieu de culture, qu'une faible teinte vert pâle. Enfin, à 10^{-3}, les explantats ont peu proliféré et présentent une coloration jaune homogène.

Un examen anatomique de ces cultures montre que la DSM produit un ralentissement de la multiplication cellulaire ; à 10^{-3}, le tissu néoformé est constitué de moitié moins d'assises cellulaires que chez le témoin et les nodules cribro-vasculaires y sont moins nombreux.

Nous avons ensuite prélevé les tissus néoformés dépigmentés sur des explantats développés sur des concentrations de DSM de 10^{-4}, 5.10^{-4} et 10^{-3}, en éliminant, dans la mesure du possible, les tissus préexistants, et nous les avons repiqués sur milieu de base avec substances de croissance, additionné ou non de 20 % de son volume de lait de coco.

Après six semaines de culture, on constate d'une manière générale, que les colonies tissulaires issues des ensemencements traités par 10^{-4} de DSM sont presque toutes vertes, celles provenant de cultures traitées par 5.10^{-4} sont panachées et celles dérivant d'explantats développés sur 10^{-3} sont blanches avec quelques régions vertes ; ces dernières colonies présentent, de plus, une vitesse de croissance inférieure aux précédentes.

L'incorporation de lait de coco au milieu n'agit pas sur la pigmentation des cultures obtenues, mais favorise beaucoup leur développement ; en effet, quelle que soit l'origine de la colonie, les milieux contenant le facteur naturel permettent une croissance trois ou quatre fois supérieure à celle des témoins sans lait de coco.

Après plusieurs repiquages successifs, et en éliminant à chaque fois les parties vertes des colonies, nous avons pu isoler, au cinquième

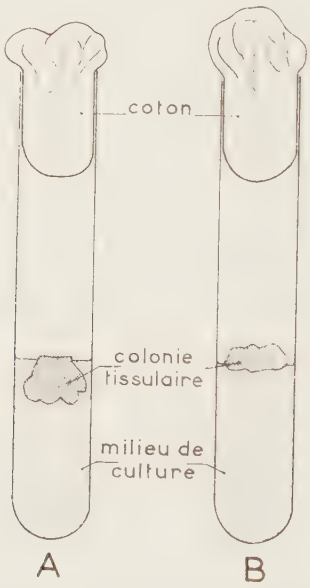


Fig. 7. — Cultures de tissus de Topinambour se développant sur milieu de base additionné de 20 % de son volume de lait de coco (5e repiquage).
Ces cultures sont isolées à partir d'ensemencements primaires de fragments de rhizome sur milieu de base seul (A) ou additionné de 10^{-3} de DSM (B).
A : culture normalement pigmentée. — B : culture blanche.

repiquage, à partir des explantats traités par 10^{-3} de DSM, une souche absolument dépigmentée. Cette souche dont la croissance est très lente et le maintien difficile sur milieu témoin, se développe remarquablement en présence de lait de coco. Il est même nécessaire de la repiquer fréquemment, toutes les trois à quatre semaines, sur milieu enrichi, sinon, elle meurt.

Son développement est très différent de celui de la souche normalement verte (fig. 7). Alors que cette dernière se développe à l'intérieur du milieu, la souche dépigmentée ne pousse qu'à la surface et en dehors du substrat gélosé, ce qui traduit certainement des modifications importantes du métabolisme général, et probablement du métabolisme respiratoire.

Les divers essais que nous avons entrepris jusqu'ici (changement de milieu et de conditions de culture, greffes, etc...) ne nous ont pas permis de faire reverdir cette souche.

Il est donc possible d'obtenir, à partir de parenchyme vasculaire de rhizome de Topinambour traité par la DSM, une souche de tissus dépigmentés. Ces observations, qui confirment les résultats antérieure de Bertossi [**10**], nous ont toutefois permis de préciser le rôle joué par le lait de coco dans la croissance de cette souche, ainsi que les modalités de son développement.

c. Conclusions.

Il semble donc que la sensibilité des tissus végétaux, cultivés *in vitro*, à l'action de la DSM soit variable selon les espèces : les tissus de Carotte se sont montrés extrêmement sensibles puisqu'une concentration de 10^{-5} de cet antibiotique bloque presque complètement leur croissance, alors que 5.10^{-4} ne fait que ralentir légèrement la croissance de ceux de Topinambour. Cette sensibilité est également différente de celle des plantules expérimentées, puisque le seuil d'action se situe à 10^{-6} pour le tissu de Carotte et à 5.10^{-4} pour le Topinambour.

D'autre part, en ce qui concerne la pigmentation, les seuils d'action, situés plus bas (10^{-5}) pour la Carotte que pour le Topinambour (10^{-4}), sont également nettement inférieurs à ceux des plantules d'Orge, de Maïs ou de Pois.

Enfin, bien que nous n'ayons pas entrepris, sur la Carotte en particulier, d'expérimentation approfondie sur ce point, il semble que l'obtention de souches incolores soit beaucoup plus facile chez le Topinambour que sur ce premier matériel. Les souches incolores de Topinambour, d'autre part, présentent des caractéristiques de croissance particulières et une sensibilité très augmentée à l'influence stimulante qu'exerce le lait de coco.

B. Végétaux inférieurs.

Nous avons ensuite étudié l'action de la DSM sur des végétaux

inférieurs. Les expériences précédentes suggèrent, en effet, que l'antibiotique n'agirait que sur des régions méristématiques indifférenciées, sur des zones en voie de différenciation, ou enfin, sur des régions parenchymateuses à condition qu'elles aient subi une dédifférenciation préalable. Or, dans certains organes des végétaux inférieurs, la multiplication cellulaire se produit sans qu'une dédifférenciation complète intervienne et il nous a semblé intéressant d'analyser les réactions induites, dans ce cas, par l'antibiotique.

Afin de pouvoir contrôler les modalités de l'action de la DSM, nous avons expérimenté sur des végétaux que l'on peut cultiver aseptiquement sur des milieux relativement simples. Nous mentionnerons successivement les résultats obtenus avec des prothalles de Fougères, des gamétophytes de Sphaignes et des Algues unicellulaires.

1) *Prothalles de Fougères.*

Nous avons utilisé une souche de prothalles de *Gymnogramme calomelanos* (Und.), isolée par Mme Hurel-Py. Ces prothalles sont cultivés à la lumière sur le milieu de base additionné ou non de DSM à des concentrations variant de 10^{-6} à 10^{-2}.

Après 45 jours de culture, on constate que les concentrations les plus faibles de DSM (10^{-6}, 10^{-5}) sont sans action sur les colonies prothalliennes. La concentration de 10^{-4} ne provoque qu'une légère diminution de leur croissance, alors que celle-ci devient très irrégulière, à 10^{-3}. Enfin, à 5.10^{-3}, seuls quelques rares prothalles parviennent à se développer difficilement, tandis que la concentration de 10^{-2} inhibe la totalité des colonies.

D'autre part, on note que la concentration d'antibiotique doit atteindre 10^{-3} pour qu'apparaissent les premiers troubles de la pigmentation ne se traduisant que par un éclaircissement de la couleur verte des prothalles. Par contre, à 5.10^{-3}, la base de ceux qui se développent est totalement dépigmentée, tandis que leur sommet est très légèrement vert.

Dans une deuxième expérience, on repique les prothalles dont la pigmentation est altérée, sur milieu de base sans DSM, additionné ou non de 20 % de son volume de lait de coco. Dans ces conditions, on constate, quel que soit le milieu utilisé, que ceux provenant de colonies initialement traitées par une concentration de 10^{-3} de DSM se développent alors normalement et retrouvent leur coloration verte tandis que meurent la plupart de ceux qui avaient subi l'action de 5.10^{-3} d'antibiotique. Toutefois, les rares colonies qui réussissent à survivre et à croître, sont vertes.

S'il est donc possible d'obtenir, par action de la DSM, une importante diminution de la coloration des prothalles de Fougères, cette altération n'est jamais totale ni définitive. Il faut remarquer, d'autre part, que les prothalles sont particulièrement résistants,

puisque le seuil d'action se situe à 10^{-4} pour la croissance et à 10^{-3} pour la pigmentation.

2) *Gamétophytes de Sphaignes.*

On sait [**93**] que les gamétophytes de Sphaignes peuvent se cultiver, à la lumière, sur un milieu analogue à celui permettant la croissance, *in vitro*, de prothalles de Fougères. Nous avons donc cultivé ces gamétophytes sur milieu de base seul ou additionné de diverses concentrations de DSM (10^{-6} à 10^{-2}).

Alors que la croissance est normale à 10^{-6}, dès la concentration de 10^{-5}, les tiges de gamétophytes ne se développent plus, et pour les concentrations supérieures, elles se nécrosent et meurent. Signalons, de plus, que le matériel ensemencé semble toujours garder, tant qu'il reste vivant, une coloration normale.

Il semble donc que la sensibilité à l'antibiotique soit particulièrement grande chez la Sphaigne, puisque, dès la concentration de 10^{-5} de DSM, la croissance est bloquée, sans qu'apparaissent de modifications pigmentaires nettes.

3) *Algues unicellulaires.*

Nos expériences ont porté sur deux types d'Algues flagellées : *Euglena gracilis* (Pringsh.) pourvue de huit à dix chloroplastes par individu, et *Chlamydomonas rheinardii* (Dangeard) ne possédant qu'un seul gros chromatophore.

Ces Algues sont cultivées à la lumière sur le milieu dont la composition a déjà été indiquée (p. 40) auquel sont ajoutées ou non des doses de DSM comprises entre 10^{-6} et 10^{-2}.

Chez les Euglènes, après trois jours de culture, on constate que les plus faibles doses (10^{-6}, 10^{-5}) n'affectent ni leur croissance, ni leur pigmentation.

Ce n'est qu'à partir de 10^{-4}, concentration pour laquelle le développement n'est pas ralenti, qu'apparaissent les premiers troubles, se traduisant par une légère décoloration de la culture. Si l'on augmente la dose, très vite, la croissance est alors touchée en même temps que s'accentuent les modifications de la pigmentation. C'est ainsi qu'à 5.10^{-3} la croissance est inhibée de 50 % et qu'à 10^{-2} le développement est pratiquement nul ; à cette dernière dose, les organismes sont incolores.

Si, après centrifugation et lavage, des Euglènes ainsi traitées par l'antibiotique sont repiquées dans un milieu sans DSM, on constate, après huit jours que les cultures issues des Algues soumises à la concentration de 10^{-4} de DSM sont normalement pigmentées, tandis que celles provenant d'Euglènes traitées par 10^{-3} et 5.10^{-3} sont définitivement blanches.

Confirmant les expériences de nos devanciers [**29, 163, 228**], il nous a donc été possible de dépigmenter une souche d'Euglènes

par action de la DSM. Le seuil d'action sur la genèse pigmentaire se situe à 10^{-4}, mais une dépigmentation définitive n'est obtenue qu'après 72 heures d'action à la concentration minimum de 10^{-3}.

Quant aux *Chlamydomonas* on note, dans des conditions de culture identiques à celles des Euglènes, que les concentrations les plus basses, jusqu'à 10^{-4}, n'affectent ni la croissance, ni la pigmentation des cultures. Il faut aller jusqu'à des concentrations de l'ordre de 10^{-3} pour que la croissance soit notablement ralentie et atteindre 10^{-2} pour bloquer entièrement le développement des Algues. Cependant, même dans ce dernier cas, la pigmentation n'est pas affectée.

Après centrifugation, lavage et ensemencement sur milieu de base sans DSM et exposition à la lumière, on note que les cultures provenant d'un traitement par les plus faibles concentrations (10^{-6} à 10^{-4}) sont identiques aux témoins tandis que celles ayant été soumises à 10^{-3} et 5.10^{-3} de DSM, bien que plus lentes à se développer, sont normalement pigmentées. Enfin aucune croissance n'est visible après un traitement par 10^{-2} d'antibiotique.

La souche de *Chlamydomonas* utilisée semble donc très résistante à l'action de la DSM. Le seuil d'action se situe à 10^{-3}, mais l'antibiotique n'affecte alors que la croissance sans qu'il soit possible de déceler une action quelconque sur la pigmentation. Il faut d'ailleurs signaler que nous avons pu cultiver pendant plus de deux ans à l'obscurité, sur ce même milieu de base, une souche chlorophyllienne de *Chlamydomonas*, ce qui confirme la grande stabilité de la pigmentation de cette Algue.

En résumé, les deux types d'Algues unicellulaires que nous avons étudiés réagissent donc, dans des conditions expérimentales semblables, de manière très différente à l'action de la DSM. Alors que l'Euglène donne très facilement une souche dépigmentée, à croissance normale, le *Chlamydomonas*, dans les mêmes conditions, est extrêmement résistant : sa croissance est seulement ralentie, tandis que sa pigmentation n'est pas altérée.

C. Résumé et conclusions.

Les observations effectuées sur divers types de végétaux traités par la DSM montrent que cet antibiotique exerce, en général, une double action : sur la croissance et sur la pigmentation.

En ce qui concerne la croissance, le seuil d'activité peut varier entre de larges limites. C'est ainsi que les tissus de Carotte sont particulièrement sensibles et réagissent déjà à des doses de l'ordre de 10^{-6} de DSM. A l'opposé, d'autres végétaux sont beaucoup plus résistants, le seuil d'action variant de concentrations supérieures à 10^{-4} pour les prothalles de Fougères et les tissus de Topinambour,

à 10^{-3} pour les Euglènes et les *Chlamydomonas*. La sensibilité des plantules de végétaux supérieurs se situe entre ces valeurs extrêmes.

Quant à la pigmentation, les observations que nous avons effectuées nous permettent de tirer plusieurs conclusions de portée générale.

Tout d'abord, il ne semble exister aucune relation directe entre les décolorations des matériels soumis à l'action de la DSM et les troubles de la croissance.

Nous avons, d'autre part, établi que les modifications pigmentaires provoquées par la DSM n'intéressaient que les régions en cours de différenciation au moment de l'action de l'antibiotique. Chez les plantules des végétaux supérieurs, la DSM, en effet, ne détruit pas la pigmentation des organes verts existant avant le traitement, de même qu'elle n'empêche pas la chlorophyllogenèse de ceux se formant après son action, à condition, toutefois, que la dose utilisée n'atteigne pas le seuil de toxicité, variable suivant les types de végétaux.

Il convient cependant de remarquer que deux des faits rapportés semblent en contradiction avec certaines des conclusions que nous venons de formuler. C'est ainsi que, chez des plantules d'Orge et de Maïs issues de graines traitées par des doses moyennes de DSM, la pointe de la première feuille est verte et que, d'autre part, des parties dépigmentées de tissus de Topinambour donnent souvent naissance à des colonies panachées. En fait, la contradiction n'est qu'apparente, si l'on admet que dans l'un et l'autre cas des cellules plus ou moins différenciées existent dans les régions intéressées. Nous reviendrons ultérieurement sur ce point lorsque nous exposerons les résultats de nos études cytologiques.

Enfin, nous avons montré que les tissus parfaitement décolorés par la DSM le sont définitivement ; il ne nous a jamais été possible de les faire reverdir.

Rappelons, pour terminer, que nous n'avons pas pu observer de modifications pigmentaires chez quelques végétaux : tissus de Carotte, gamétophytes de Sphaignes, *Chlamydomonas*. Chez ces plantes, le seuil de toxicité se situe donc à une concentration en DSM inférieure à celui du début de l'action antichlorophyllienne. Ce fait n'est guère surprenant, car il existe des différences considérables entre les divers végétaux chlorophylliens vis-à-vis de la résistance présentée par les mécanismes de synthèse lorsque ces végétaux sont soumis à l'action d'agents variés. On sait, par exemple, qu'outre la DSM, l'obscurité, une élévation de température, ou des radiations ultraviolettes « décolorent » les Euglènes, alors que dans des conditions identiques, les *Chlamydomonas* restent chlorophylliens.

II. AUTRES SUBSTANCES

Nous avons tenté d'élargir le champ de nos observations en étudiant l'action, sur les végétaux, d'autres composés connus pour leurs propriétés antibiotiques ou antichlorophylliennes : auréomycine, terramycine, acide 3-(α-iminoéthyl)-5-méthyltétronique (AAMT), 3-amino 1,2,4-triazole (AT), pénicilline. Toutes ces substances ont une structure bien différente de celle de la DSM. Certaines d'entre elles, cependant, présentent des liens de parenté qu'il convient de souligner ici. C'est ainsi que l'auréomycine et la terramycine sont des tétracyclines ne différant que par quelques atomes d'hydrogène et de chlore et que, d'autre part, les molécules d'AAMT et d'AT présentent des configurations spatiales très voisines les unes des autres.

Afin de comparer l'action de ces substances à celle de la DSM, nous les avons fait agir de préférence sur l'Orge ou le Maïs, en complétant quelquefois notre expérimentation par l'utilisation d'autres matériels, variables selon les substances.

A. Tétracyclines.

Nous étudierons successivement l'action de l'auréomycine et de la terramycine sur la croissance et la pigmentation de plantules d'Orge. Ces deux antibiotiques ont été employés sous forme de chlorhydrates et les concentrations sont exprimées en antibiotique-base.

1) *Auréomycine.*

Dans une première expérience, des graines d'Orge sont traitées, dans des conditions identiques à celles employées pour la DSM, par trempage pendant 24 heures dans des solutions d'auréomycine de concentrations comprises entre 10^{-7} et 10^{-2}.

L'observation des plantules, 25 jours après le repiquage dans les tubes de culture, a fourni les résultats qui sont résumés dans la figure 8. On y remarque que les plus faibles concentrations (10^{-7} à 10^{-5}) n'ont exercé aucune action sur la croissance, le seuil d'action se situant vers 5.10^{-5}. L'inhibition augmente ensuite très rapidement, et à 5.10^{-3} la croissance devient négligeable pour s'annuler totalement à 10^{-2}.

Quant au seuil d'action sur la pigmentation, il est situé aux environs de 10^{-4}. Au-dessus de cette dose, les altérations constatées sont en tout point identiques à celles observées sous l'influence de la DSM.

Signalons enfin que l'inhibition du système radiculaire est plus précoce et plus marquée que celle s'exerçant sur les tiges, alors que les deux phénomènes sont confondus dans le cas de la DSM.

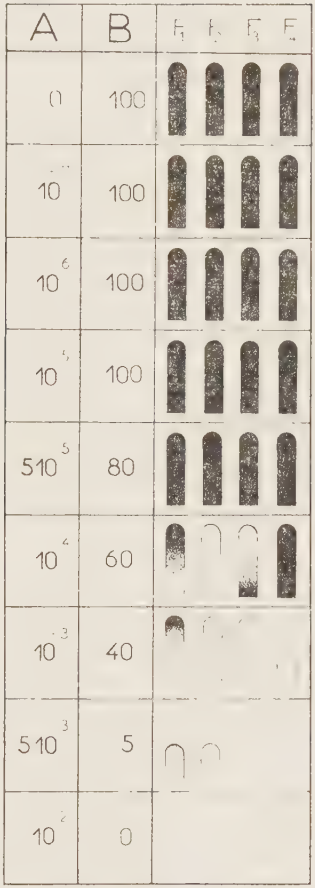


Fig. 8. — Croissance et pigmentation de plantules d'Orge âgées de 30 jours, provenant de graines traitées pendant 24 heures par diverses concentrations d'auréomycine.

A : concentrations d'auréomycine utilisées — B : croissance des plantules exprimée en % des témoins. — F_1, F_2, F_3, F_4 : feuilles des plantules, numérotées selon leur ordre d'apparition.

Les différences de longueur entre les feuilles ayant achevé leur développement ne sont pas représentées. Seules, les ébauches foliaires en cours de croissance sont figurées avec des tailles plus petites. L'intensité et la répartition de la pigmentation sont représentées par une teinte plus ou moins foncée.

Si l'on excepte le fait que le seuil d'action de l'auréomycine, tant sur la croissance que sur la pigmentation, se situe à des concentrations sensiblement inférieures à celles de la DSM et si l'on écarte le fait que l'inhibition provoquée par l'auréomycine est plus marquée sur les racines que sur les tiges, on peut conclure que l'action de cet antibiotique est tout à fait comparable à celle qu'exerce la DSM. Ajoutons que, dans ce cas encore, les feuilles dépigmentées ne reprennent jamais une couleur normale.

Au cours d'une seconde expérience, des germinations d'Orge ont été traitées par l'auréomycine, selon le schéma utilisé pour la DSM p. 56, avant, pendant ou après la germination, mais à la concentration de 10^{-4}, la concentration de 10^{-3} étant par trop toxique.

A cette différence de concentration près, on obtient dans ce cas encore, des symptômes exactement identiques à ceux observés sous l'action de la DSM. C'est ainsi qu'un seul traitement provoque des altérations de croissance et de pigmentation d'autant plus précoces qu'il est réalisé plus tôt, et que, sous l'action de deux traitements consécutifs, les mêmes manifestations sont plus accentuées ; enfin, le traitement continu inhibe très vite toute croissance et pigmentation. De même, l'auréomycine ne manifeste son action antichlorophyllienne que sur les feuilles qui se forment au moment où elle est en contact avec la plantule ; la pigmentation des feuilles différenciées avant ou se différenciant après son action n'étant pas altérée.

En résumé, on peut dire que l'auréomycine produit sur l'Orge des modifications morphologiques précédant des modifications pigmentaires tout à fait comparables à celles provoquées par la DSM. Les seules différences notables concernent l'action inhibitrice préférentielle exercée sur le système radiculaire et le fait que la DSM est sensiblement moins active que l'auréomycine.

2) *Terramycine.*

L'utilisation de la terramycine, dans les mêmes conditions de culture que les expériences faites avec l'auréomycine sur l'Orge, produit des effets identiques à ceux induits par ce dernier antibiotique, aussi bien sur la morphogenèse que sur la pigmentation des plantules. Les seuils d'action sur ces deux processus correspondent respectivement à des concentrations de 10^{-5} et 10^{-4} d'antibiotique. La terramycine semble donc légèrement plus active encore que l'auréomycine.

En conclusion, nous pouvons donc dire qu'à des concentrations cinq à six fois plus faibles, les symptômes induits par les deux tétracyclines sur la morphogenèse et la pigmentation de plantules d'Orge sont sensiblement identiques à ceux induits par la DSM.

B. Acide 3-(α-iminoéthyl)-5-méthyltétronique (AAMT).

Nous décrirons tout d'abord les expériences faites sur le Maïs puis les vérifications effectuées ensuite sur l'Orge. Enfin nous mentionnerons quelques essais de cette substance sur les *Chlamydomonas.*

1) *Maïs.*

Suivant les mêmes techniques que celles employées pour l'étude des autres substances, des graines de Maïs sont traitées pendant 24 heures par trempage dans des solutions d'AAMT à des concentrations variant de 10^{-7} à 10^{-2}.

Aux concentrations les plus faibles (10^{-7} à 10^{-5}), ni la croissance,

ni la morphologie, ni la pigmentation des plantules ne sont modifiées (fig. 9). Il faut atteindre la concentration de 5.10^{-5} pour observer une légère diminution de la croissance et des troubles de la morphogenèse qui se traduisent par un raccourcissement et une

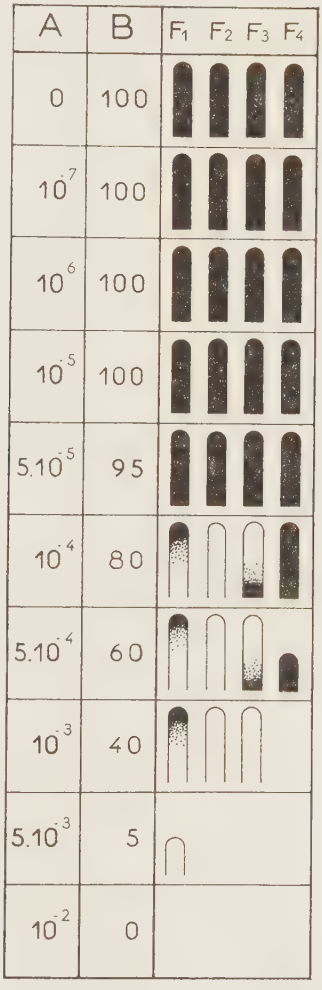


Fig. 9. — Croissance et pigmentation de plantules de Maïs âgées de 30 jours, issues de graines traitées pendant 24 heures par des concentrations d'AA MT variant de 10^{-7} à 10^{-2}.

A : concentrations d'AAMT employées. — B : croissance des plantules exprimée en % des témoins. — F_1, F_2, F_3, F_4 : intensité et répartition de la pigmentation dans les diverses feuilles des plantules, numérotées suivant leur ordre d'apparition. Les différences de longueur des diverses feuilles ayant achevé leur croissance ne sont pas représentées, sauf dans le cas d'ébauches foliaires en cours de développement.

ramification moins accentuée du système radiculaire. Ces deux modifications s'accentuent ensuite jusqu'à 10^{-3} d'AAMT, alors que la croissance des plantules n'est plus que de 60 % de celle des témoins. La racine principale, très courte, ne se ramifie plus. Enfin, des doses plus fortes, très toxiques, ne permettent pas au coléoptile

de se développer (5.10^{-3}) et peuvent même inhiber toute germination (10^{-2}).

Les premières altérations de la pigmentation ne sont visibles que chez les plantules provenant de graines traitées par 10^{-4} d'AAMT. Ces modifications, qui sont tout à fait comparables à celles induites par la DSM et les tétracyclines, s'accentuent naturellement avec l'augmentation des concentrations, jusqu'à 5.10^{-3}, dose à laquelle seule, une feuille entièrement blanche, parvient difficilement à percer le coléoptile. Dans ce dernier cas, d'ailleurs, les plantules meurent rapidement sans pouvoir se développer.

L'AAMT produit donc des troubles de la croissance et de la pigmentation analogues à ceux observés sous l'action de la DSM ou des tétracyclines ; les seuils d'action se situent à 5.10^{-5} pour la morphogenèse, et à 10^{-4} pour la pigmentation.

D'autre part, comme dans les cas précédents, l'AAMT inhibe définitivement et de manière plus importante encore que la DSM la pigmentation des feuilles qui se forment en sa présence, mais celles formées ultérieurement sont normalement vertes, à condition que la concentration utilisée permette une croissance suffisante.

Après avoir réalisé un traitement, à la concentration de 10^{-4}, avant, pendant, ou après la germination, nous avons pu constater que l'AAMT n'agit sur la pigmentation foliaire que lorsqu'il est en contact avec la plantule. Il engendre alors des feuilles blanches, celles formées avant ou se formant après son action étant normalement vertes.

Enfin il faut signaler que les pigments anthocyaniques présents, en faible quantité, dans le coléoptile, la base de la tige et la partie supérieure de la racine, ne sont pas détruits ; ils semblent même augmenter sous l'action de doses moyennes d'AAMT (10^{-4}, 5.10^{-4}).

2) *Orge.*

Dans une série d'expériences sur l'Orge, nous avons trouvé des résultats sensiblement équivalents qui nous ont conduit à formuler les mêmes conclusions quant aux symptômes engendrés, et à admettre que les seuils d'action et de toxicité étaient les mêmes que dans le cas du Maïs.

Signalons accessoirement que l'AAMT pénètre facilement dans le végétal si on l'applique par pulvérisation sur les feuilles en présence de Tween 80 à la concentration de 0,5 % ce qu'il n'était pas possible d'obtenir avec la DSM ou les tétracyclines. Les altérations provoquées chez les plantules traitées par cette technique, ont été identiques à celles observées lorsque nous avons employé les schémas expérimentaux habituels.

3) *Chlamydomonas.*

La facilité de pénétration de l'AAMT et sa très nette action

antichlorophyllienne nous ont incité à traiter, par cette substance, des *Chlamydomonas*, que l'on sait très résistants à l'action de la DSM.

Cependant, en dépit de ces propriétés, les subcultures réalisées après des traitements de deux à dix jours par des concentrations d'AAMT de 10^{-6} à 10^{-2} ne nous ont pas permis d'observer de modifications pigmentaires, les plus fortes concentrations utilisées (10^{-3}, 10^{-2}) provoquant simplement une inhibition de la croissance. Les *Chlamydomonas* sont donc aussi résistants à l'action antichlorophyllienne de l'AAMT qu'à celle de la DSM.

C. Aminotriazole (AT).

Nous avons traité, par diverses concentrations d'AT, soit des graines de Maïs, soit des plantules de cette même plante en cours de développement, par addition au milieu de culture ou par pulvérisation sur les feuilles. Les modifications observées sont identiques quel que soit le mode de traitement et sont presque semblables à celles que provoque l'AAMT. L'action sur la morphogenèse débute à 5.10^{-5}, et celle sur la pigmentation à 10^{-4}. Les parties dépigmentées sont, comme sous l'action de l'AAMT, plus parfaitement « blanchies » que celles obtenues par l'action de la DSM et ne reverdissent pas. Les feuilles formées avant ou après l'action de la substance sont normalement vertes.

L'AT produit donc chez le Maïs des troubles de la croissance et de la pigmentation, analogues à ceux induits par les autres substances étudiées jusqu'ici : DSM, tétracyclines, AAMT. Toutefois, certains symptômes observés, et notamment une dépigmentation plus complète des feuilles les plus atteintes par cette substance, semblent rapprocher son action de celle de l'AAMT.

D. Pénicilline.

On sait que la pénicilline est le seul antibiotique susceptible de provoquer, dans certaines conditions, une accélération de la croissance des végétaux, mais on n'a pas mentionné, jusqu'ici, de modifications pigmentaires induites par cet antibiotique.

En effet, si l'on cultive des fragments de rhizome de Topinambour sur milieu de base additionné de 1 600 000 U.I. de pénicilline G par litre, condition pour laquelle on obtient une prolifération des explantats égale à celle provoquée par l'acide β indole acétique à la concentration de 5.10^{-7}, les tissus néoformés en présence de l'antibiotique présentent une pigmentation analogue à celle des témoins maintenus en présence d'auxine.

Nous avons, dans ce domaine, vérifié les travaux de Camus et Lance [17] et les avons complétés en tentant d'isoler une souche de tissus de Topinambour sur pénicilline à partir de cals primaires.

Nous avons, pour cela, pratiqué des séries de repiquages, toujours sur le même milieu, et l'on constate qu'il est effectivement possible d'obtenir une souche à croissance indéfinie. Cependant, dans ces conditions, on finit par observer, à partir du quatrième ou cinquième repiquage, c'est-à-dire après six mois de culture environ, que les tissus soumis à l'action de la pénicilline perdent graduellement la faculté de synthétiser de la chlorophylle, alors que ceux maintenus sur acide β indole acétique gardent toujours la même coloration verte. Les colonies sur pénicilline qui se développent moins profondément dans le milieu que la souche normale présentent une couleur blanc jaunâtre à leur partie supérieure, jaune-brun au contact du milieu, alors qu'elles conservent une teinte vert pâle dans leur région centrale.

La pénicilline provoque donc, à la longue, une inhibition partielle de la pigmentation, qui se limite aux zones maintenues en contact direct avec l'antibiotique.

E. Résumé et conclusions.

Parmi les cinq substances que nous venons d'étudier, quatre d'entre elles, l'auréomycine, la terramycine, l'AAMT et l'AT, provoquent des modifications sensiblement comparables aussi bien de la morphogenèse que de la pigmentation. Elles sont toutefois cinq fois plus actives que la DSM sur l'Orge et le Maïs, leurs seuils d'action se situant en effet, pour la morphogenèse, à 5.10^{-5}, et à 10^{-4} pour la pigmentation, alors qu'ils ne sont que respectivement de 10^{-4} et de 5.10^{-4} pour la DSM.

Les modifications pigmentaires irréversibles qu'elles engendrent ne se manifestent, comme dans le cas de la DSM, que sur les feuilles qui se développent en leur présence. Celles se formant avant ou après leur action sont normalement pigmentées.

Outre leur toxicité, les quatre autres substances se différencient de la DSM, ainsi que les unes des autres par quelques caractères. C'est ainsi que les tétracyclines inhibent beaucoup plus rapidement que la DSM le système radiculaire des plantules, et que l'AAMT et l'AT provoquent une décoloration des feuilles d'Orge et de Maïs paraissant plus complète que la DSM et les tétracyclines.

La dernière substance, la pénicilline, doit être mise à part puisque, non seulement elle n'est pas toxique, mais elle favorise au contraire la croissance des tissus de Topinambour. De plus, elle n'induit qu'une inhibition partielle de la chlorophyllogenèse et seulement après plusieurs mois d'action.

CHAPITRE II

ÉTUDE DE QUELQUES MODIFICATIONS DES PIGMENTS FOLIAIRES DE MAÏS ET D'ORGE SOUS L'ACTION DE COMPOSÉS ANTICHLOROPHYLLLIENS

Afin de préciser la nature des altérations pigmentaires rapportées ci-dessus, nous avons entrepris une étude comparée des pigments extraits de plantules d'Orge ou de Maïs, normales ou traitées par quelques composés. Nous décrirons tout d'abord les caractéristiques pigmentaires des premières, puis nous exposerons, en essayant de les chiffrer, les modifications provoquées chez les secondes par la DSM, l'AAMT et l'AT. Enfin nous résumerons brièvement les tentatives effectuées pour identifier quelques pigments nouveaux apparaissant en quantités appréciables lors de certains traitements.

I. — LES PIGMENTS FOLIAIRES DE PLANTULES NORMALES DE MAIS ET D'ORGE

Nous avons surtout, au cours de nos expériences, employé le Maïs, mais nous avons également vérifié que les observations réalisées étaient identiques à celles que l'on peut effectuer sur l'Orge.

Les plantules analysées, normales ou traitées, sont cultivées dans les conditions décrites précédemment, et il convient de préciser ici que les prélèvements de matériel sont toujours faits à 9 heures du matin, c'est-à-dire après trois heures d'éclairement.

A. Analyse qualitative des pigments des feuilles de plantules de Maïs et d'Orge.

Nous avons indiqué (fig. 1) que la séparation chromatographique des pigments foliaires contenus dans un échantillon prélevé dans le mésophylle d'une feuille de Maïs ou d'Orge, permet d'obtenir, après développement, six taches colorées. Après élution de chacune de ces taches par un solvant approprié, on détermine le spectre

d'absorption des solutions ainsi obtenues. Nous avons alors été en mesure d'identifier les principaux pigments foliaires ainsi isolés.

Cette étude nous a montré que la tache 1, vert-olive correspond à la chlorophylle *b*, la tache 2, bleu-vert, à la chlorophylle *a*, la tache 3, jaune pâle, à de la violaxanthine impure, la tache 4, jaune d'or, à la lutéine, la tache 5, verdâtre, à la phéophytine *a*, et enfin, la tache 6, jaune orangé, au β-carotène.

D'après le test de Zscheile et Comar [**232**], les chlorophylles *a* et *b* ainsi séparées sont presque pures (97 à 99 %). De même les rapports entre les maximums et les minimums des spectres d'absorption donnés par la lutéine, la phéophytine *a* et le β-carotène, permettent de conclure que leur pureté est comprise entre 95 et 99 %. La violaxanthine, par contre, migre avec un autre caroténoïde présent en faible quantité qui doit être de la néoxanthine comme l'ont montré les travaux de Kay et coll. [**98**].

B. Analyse quantitative des pigments foliaires de Maïs.

Dans le but de préciser les conditions dans lesquelles doivent être prélevés des échantillons aussi comparables que possible, sur des plantes normales et traitées, nous avons étudié les variations de la teneur en pigments, soit le long d'une même feuille, soit entre les feuilles de même ordre prélevées sur des plantules de même âge, cultivées dans des conditions identiques, soit entre les différentes feuilles d'une plantule suivant son âge.

Si l'on dose, dans une plantule de 17 jours, par exemple, les deux chlorophylles ainsi que les caroténoïdes totaux contenus dans la troisième feuille, divisée pour cela en tronçons de 2 cm, on constate que leur concentration décroît régulièrement de la pointe de la feuille jusqu'à la base de celle-ci (fig. 10). En ce dernier point, on ne retrouve plus que 65 à 70 % des pigments présents dans la pointe. Une telle diminution provient vraisemblablement de l'importance croissante du volume des nervures par rapport au mésophylle lorsqu'on descend dans le limbe, vers la base de celui-ci, car nous avons observé d'autre part, que la teneur en pigments au niveau des formations conductrices est inférieure de moitié à celle des régions entièrement parenchymateuses.

Toutes les feuilles, quel que soit leur âge, ou leur ordre d'apparition sur la plantule, présentent un tel gradient.

D'autre part, nous avons pu constater qu'en prélevant des échantillons identiques, au même endroit, sur des feuilles de même ordre, appartenant à des plantules aussi semblables que possible, cultivées dans les mêmes conditions, on observait, en opérant avec 12 échantillons, des variations maximum par rapport à la moyenne de plus ou moins 5%, pour la teneur en chlorophylle *a*, et de plus ou moins 6 %, pour la chlorophylle *b* et les caroténoïdes.

Enfin, nous avons déterminé les variations possibles de la quantité de pigments, contenue dans une zone donnée, pour les trois premières feuilles d'une même plantule et nous avons suivi l'évolution de ces variations avec l'âge des plantules.

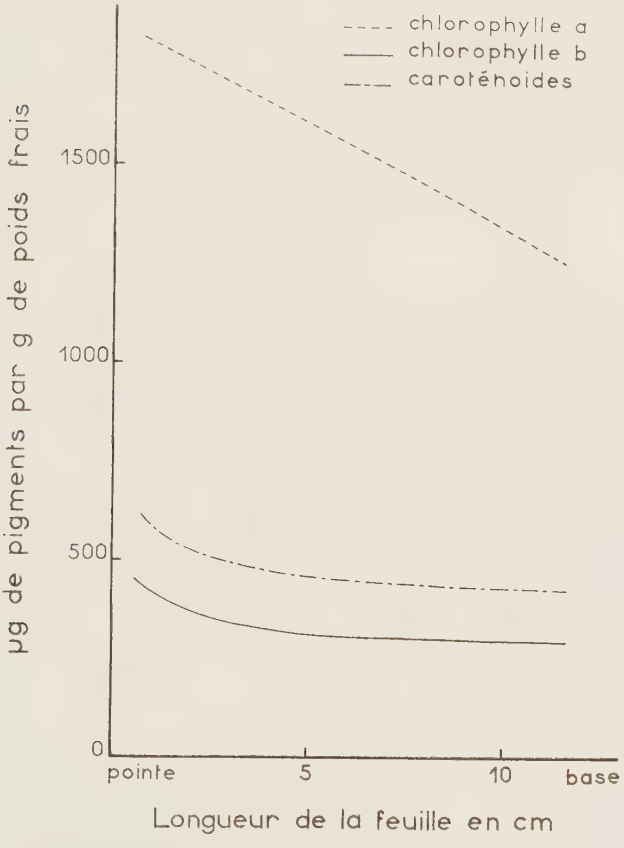


Fig. 10. — Variations de la teneur en pigments des diverses régions du limbe de la troisième feuille d'une plantule de Maïs âgée de 17 jours.

L'examen des courbes de la figure 11, qui résume les résultats obtenus, permet de conclure que la teneur en pigments d'une feuille considérée varie avec l'âge de cette feuille. La concentration pigmentaire augmente dans la jeune feuille en voie de croissance, passe par un maximum qui est généralement atteint en même temps que la taille définitive, puis décroît plus ou moins rapidement. Le maximum se situe très tôt pour les premières feuilles (F_1 et F_2), plus tardivement pour les troisième, quatrième, etc...

Il faut noter que, plus l'ordre des feuilles est élevé, plus elles contiennent de pigments. Ceci est valable quel que soit le pigment considéré : chlorophylle *a*, chlorophylle *b* ou caroténoïdes. Toutefois la teneur relative en divers pigments, varie avec l'âge des

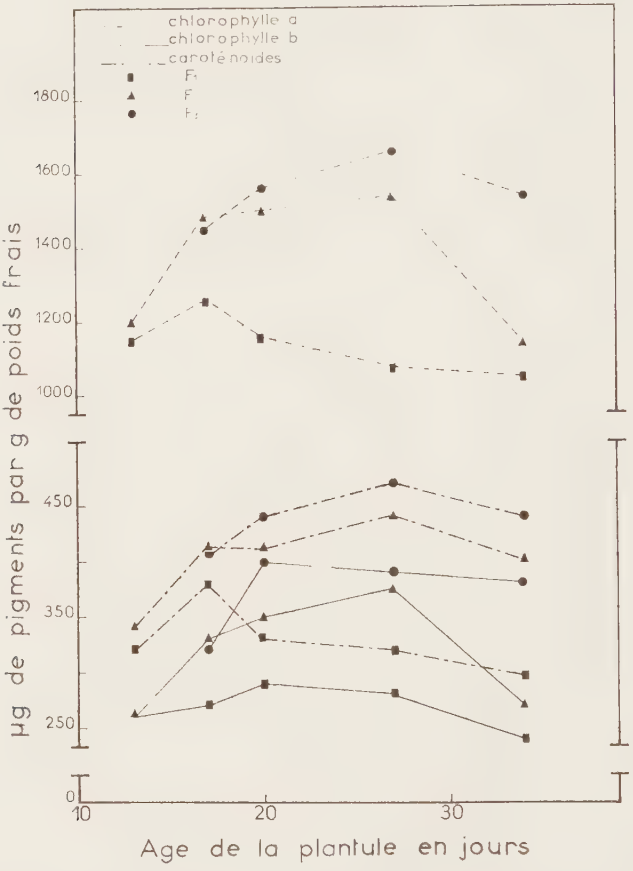


Fig. 11. — Variations, en fonction de l'âge des plantules de Maïs, de la teneur en pigments d'une zone longue de 2 cm et prélevée à 2 cm de la pointe de la feuille. L'analyse porte sur les trois premières feuilles des plantules (F_1, F_2, F_3).

feuilles. C'est ainsi que le rapport $\frac{\text{chlorophylle } a}{\text{chlorophylle } b}$ est plus élevé dans les feuilles en voie de croissance que dans celles ayant achevé leur développement. Enfin, lorsque la nature du milieu de culture varie, toutes les autres conditions étant identiques, on observe souvent une variation importante de la teneur en pigments des

plantules, cette diminution atteint 20 % par exemple lorsque des végétaux sont cultivés sur liquide de Knop au lieu de se développer sur terre.

Ces diverses observations préliminaires nous ont permis de définir les précautions à prendre pour que les comparaisons effectuées entre les feuilles modifiées conduisent à des résultats rigoureux. Outre l'indispensable identité des conditions de germination et de culture, nous avons été conduit, pour réduire au minimum l'amplitude des variations individuelles possibles, à prélever des feuilles dont la croissance était achevée, ou sur le point de l'être. D'une manière systématique, nous avons utilisé, lors de nos comparaisons, les première, deuxième et troisième feuilles de plantules âgées de vingt-cinq jours environ.

II. — VARIATIONS DE LA TENEUR EN PIGMENTS INDUITES PAR LA DIHYDROSTREPTOMYCINE (DSM), L'ACIDE 3-(α-IMINOETHYL)-5-METHYLTETRONIQUE (AAMT) ET L'AMINOTRIAZOLE (AT)

Nous avons choisi d'étudier comparativement l'action de la DSM et de l'AAMT sur le Maïs, car il nous a semblé, au cours de nos observations préliminaires sur la croissance et la pigmentation, que ces deux substances agissaient de manière légèrement différente ; l'AAMT, plus toxique que la DSM, semble provoquer un blocage de la pigmentation plus rapide et plus important que l'antibiotique. D'autre part, nous avons également porté notre effort sur l'AT, qui paraît induire des modifications analogues à celles de l'AAMT.

La substance à étudier, utilisée à la concentration de 5.10^{-4}, est ajoutée au milieu de culture, constitué par du liquide Knop lorsque les plantules sont âgées de huit jours. Elles mesurent alors de 6 à 7 cm, et la première feuille dépasse le coléoptile de 3 cm environ. Afin d'obtenir des modifications pigmentaires d'apparence sensiblement identiques, on laisse la DSM pendant 5 jours en contact avec les plantules, alors que cette durée est réduite à 2 jours pour l'AAMT et l'AT. On prélève ensuite les échantillons 11 à 12 jours après le début du traitement, les plantules étant alors âgées de 23 à 24 jours. Afin de disposer d'une plus grande quantité de matériel biologique, nous avons parfois, notamment dans le cas de l'AAMT et de l'AT, traité les plantules par pulvérisation, après nous être assuré que les réactions pigmentaires et cytologiques étaient identiques à celles provoquées par le traitement indiqué ci-dessus. Nous utilisions pour ce type de traitement 50 cm^3 de solu-

tion du corps à étudier, à la concentration de 5.10^{-4}, par lot de 25 plantules.

A. Dihydrostreptomycine (DSM).

Dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus, les plantules de 23 à 24 jours, c'est-à-dire 12 jours après le traitement, possèdent trois feuilles bien développées. La première, longue de 5 cm, vert foncé (V) à la pointe, est plus pâle à la base (VP). La pigmentation de la deuxième, longue de 13 cm, verte à la pointe, passe d'abord au vert-jaune (VJ) puis au jaune-vert (JV) à 6 cm de la pointe, pour devenir ensuite jaune (J) et finalement blanche (B) à 12 cm. La troisième feuille, longue de 13 cm, présente le même aspect, la zone verte à la pointe étant toutefois un peu plus courte.

1) *Analyse qualitative des modifications pigmentaires.*

Afin de préciser les modifications pigmentaires ainsi apparues dans les feuilles, on prélève à l'emporte-pièce, de part et d'autre de la nervure principale, des rondelles de tissus de 3 mm de diamètre qui sont ensuite écrasées suivant la technique indiquée précédemment. Alors qu'une rondelle suffit pour apprécier la nature des pigments d'une région normalement verte, on doit en utiliser trois ou quatre pour déceler les traces de pigments présents dans les régions les plus décolorées. Il est donc possible de suivre ainsi l'évolution pigmentaire le long de la feuille. Cette évolution étant d'ailleurs sensiblement la même dans tous les limbes, nous ne rapporterons ici que les observations réalisées sur une seule d'entre elles, la deuxième par exemple.

L'examen des chromatogrammes des zones de pigmentation les plus caractéristiques montre que dans la partie normalement pigmentée (V) on trouve les mêmes pigments que dans les feuilles des plantules témoins (fig. 12). Dans la région suivante, vert-jaune (VJ), on observe déjà une nette diminution de la teneur en chlorophylles et on ne peut plus déceler de phéophytine *a*, même en lumière ultraviolette, tandis que les caroténoïdes semblent peu touchés. La diminution de la teneur en chlorophylles s'accentue encore dans la région jaune-vert (JV), et, à ce niveau, on ne peut déjà plus déceler de violaxanthine, tandis que la lutéine et le β-carotène sont moins abondants. Dans la zone jaune (J), ne subsistent plus que quelques traces des deux chlorophylles, visibles seulement en lumière ultraviolette mais qu'accompagnent de la lutéïne et du β-carotène en quantité encore appréciable. Enfin, le chromatogramme de la zone dépigmentée (B) ne met plus en évidence qu'une faible quantité de β-carotène, tous les autres pigments ayant disparu ou se trouvant en proportions trop faibles pour pouvoir être décelés par la méthode utilisée.

La DSM provoque donc une inhibition progressive et simultanée des chlorophylles *a* et *b* et des xanthophylles. L'inhibition du β-carotène est moins importante, puisqu'il est encore présent dans les parties les plus dépigmentées.

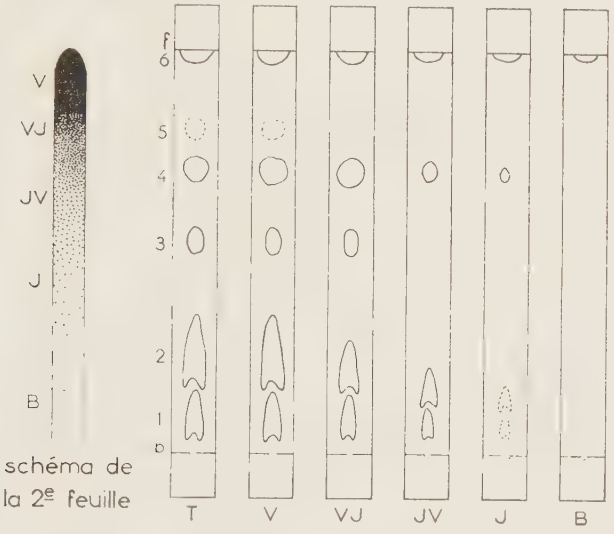


Fig. 12. — Analyse, par chromatographie sur papier, des zones de pigmentation différente de la deuxième feuille de plantules de Maïs traitées par une concentration de 5.10^{-4} de DSM, 12 jours après le traitement.

Schéma de la deuxième feuille : la diminution de l'intensité de la pigmentation de la feuille depuis la pointe jusqu'à la base est représentée par une teinte plus ou moins foncée : V, région verte ; VJ, vert-jaune ; JV, jaune-vert ; J, jaune ; B, blanche.

T, V, VJ, JV, J, B : chromatogrammes effectués à partir d'échantillons de tissus prélevés, soit sur des plantules témoins (T), soit dans des régions correspondantes de la deuxième feuille de plantule traitée (V, VJ, JV, J, B) ; b, base de départ ; f, front de solvant (bf = 18 cm) ; 1, chlorophylle b ; 2, chlorophylle *a* ; 3, violaxanthine ; 4, lutéine ; 5, phéophytine *a* ; 6, β-carotène. Les taches indiquées en pointillé ne sont décelables qu'en lumière U.V.

2) *Analyse quantitative des modifications pigmentaires.*

Alors que les dosages des pigments, effectués dans des zones différemment pigmentées de chacune des trois feuilles développées au moment du prélèvement, indiquent une diminution de tous les pigments le long de ces feuilles, on peut cependant noter que la teneur en chlorophylle *a* semble décroître plus vite que celles de la chlorophylle *b* et des caroténoïdes totaux (fig. 13, A, B, C). Ce phénomène est particulièrement net dans la partie des feuilles qui paraît encore normalement verte.

Afin de préciser ce point, nous avons calculé (fig. 13, D) les concentrations en chlorophylles *a*, *b* et caroténoïdes, par rapport à celles des mêmes pigments, mesurées dans les régions identiques de la feuille de même ordre d'une plantule témoin. On constate alors, qu'effectivement, la teneur en chlorophylle *a* décroît beaucoup plus vite que celle de la chlorophylle *b*, tandis que la décroissance des caroténoïdes est plus progressive.

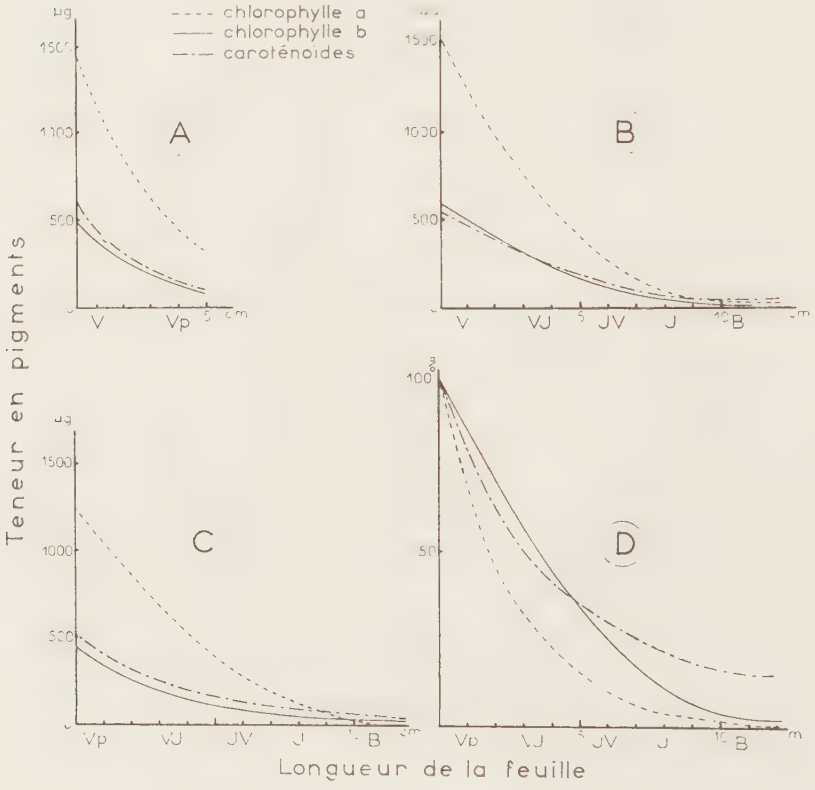


Fig. 13. — Teneur en pigments des diverses régions des trois premières feuilles d'une plantule de Maïs âgée de 24 jours, 12 jours après le traitement par 5.10^{-4} de DSM.

Les teneurs en pigments des première (courbes A), deuxième (courbes B), et troisième feuilles (courbes C), sont exprimées en valeur absolue en µg de pigments par g de poids frais. Par contre, les courbes D représentent les teneurs en pigments des régions de pigmentation différente de la troisième feuille, exprimées en % par rapport à celles des régions correspondantes de la feuille de même ordre de plantules témoins.

Les pigmentations des diverses régions des feuilles sont indiquées le long des abscisses : V, région verte ; Vp, vert pâle ; VJ, vert-jaune ; JV, jaune-vert J, jaune ; B, blanche.

Les dosages des pigments montrent donc que la DSM provoque une inhibition plus marquée de la chlorophylle *a* que de la chlorophylle *b*, tout en confirmant le fait que les caroténoïdes sont proportionnellement moins altérés.

B. Acide 3-(α-iminoéthyl)-5-méthyltétronique (AAMT).

Les modifications pigmentaires dues à l'action de l'AAMT sont sensiblement identiques à celles provoquées par la DSM. Il faut toutefois remarquer que, sous l'action de cette substance, les zones de transition entre les parties vertes et les régions blanches sont plus courtes que celles que l'on observe avec l'antibiotique. D'autre part, la dépigmentation provoquée par l'AAMT semble plus complète que celle induite par la DSM.

1) *Analyse qualitative des modifications pigmentaires.*

Comme pour les plantules traitées par la DSM, nous avons analysé, par chromatographie, les trois premières feuilles qui se sont développées après action de l'AAMT. Si l'on examine les chromatogrammes provenant de l'analyse de la deuxième feuille, par exemple, on constate qu'ils présentent sensiblement le même aspect que ceux obtenus en analysant l'action de la DSM (fig. 14). Ici, encore, on observe de haut en bas une décroissance rapide des chlorophylles *a* et *b*, une disparition de la phéophytine dès la région vert-jaune (VJ), qui s'accompagne d'une décroissance identique des xanthophylles et d'une diminution beaucoup moins rapide du β-carotène.

Remarquons toutefois qu'il apparaît ici, dès la région VJ, une tache rose sous le β-carotène. La surface de cette tache s'accroît ensuite aux dépens de celle du β-carotène. Celui-ci disparaît presque entièrement dans la région jaune. Enfin, ce pigment nouveau est le seul que l'on puisse distinguer sur le chromatogramme des régions non pigmentées de la feuille (B).

L'AAMT, comme la DSM, inhibe donc la formation des pigments normaux de la feuille. Toutefois, alors que la DSM ne fait que réduire la teneur en pigments des régions traitées, l'AAMT provoque, en outre, l'apparition d'un ou plusieurs pigments nouveaux, migrant avec, ou immédiatement après le β-carotène. En réalité, ainsi que nous le montrons ensuite, ce pigment est constitué par un mélange de plusieurs caroténoïdes.

2) *Analyse quantitative des modifications pigmentaires.*

L'examen des résultats des dosages effectués dans les trois premières feuilles des plantules traitées montre que la teneur en

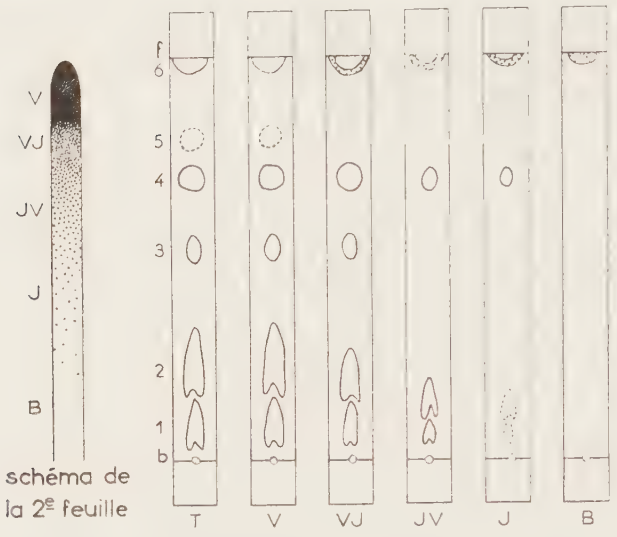


Fig. 14. — Analyse, par chromatographie, sur papier, des diverses zones de la deuxième feuille de plantules de Maïs traitées par une concentration de 5.10^{-4} d'AAMT, 13 jours après le traitement.

Schéma de la deuxième feuille : la diminution de l'intensité de la pigmentation de la feuille, depuis la pointe jusqu'à la base, est représentée par une teinte plus ou moins foncée : V, région verte ; VJ, vert-jaune ; JV, jaune-vert ; J, jaune ; B, blanche.

T, V, VJ, JV, J, B, chromatogrammes effectués à partir d'échantillons de tissus prélevés, soit sur des plantules témoins (T), soit dans les régions correspondantes de la deuxième feuille de plantules traitées (V, VJ, JV, J, B).

b, base de départ ; f, front de solvant ; 1, chlorophylle *b* ; 2, chlorophylle *a* ; 3, violaxanthine ; 4, lutéine ; 5, phéophytine ; 6, β-carotène ; les caroténoïdes nouveaux, apparaissant à ce niveau sous le β-carotène, sont représentés en grisé.

Les taches de pigments limitées en pointillé ne sont décelables qu'en lumière U.V.

pigments décroît beaucoup plus rapidement que sous l'action de la DSM quand on passe de la région V à la région JV (fig. 15, A, B, C). Ceci tient au fait que cette région de transition est relativement courte et traduit vraisemblablement une action de l'AAMT plus importante et plus rapide que celle de la DSM. D'autre part, contrairement à ce que l'on observe avec l'antibiotique, la chlorophylle *a* ne semble pas diminuer plus vite que les autres pigments.

Afin de nous en assurer, nous avons, comme pour la DSM, exprimé la teneur en pigments de la troisième feuille par rapport à la même feuille d'une plantule témoin. Nous avons alors constaté (fig. 15, D) qu'effectivement les deux chlorophylles disparaissent simultanément, sauf dans les parties VJ où la chlorophylle *a* dis-

paraît légèrement plus vite que celle de la chlorophylle *b*. Ici encore, les caroténoïdes décroissent moins rapidement que les chlorophylles. Dans les régions blanches, cependant, il ne subsiste plus ici, par rapport aux témoins, que 6 % de caroténoïdes, alors que dans des zones identiques de feuilles traitées par la DSM, la teneur résiduelle était encore de 12 à 13 % de β-carotène.

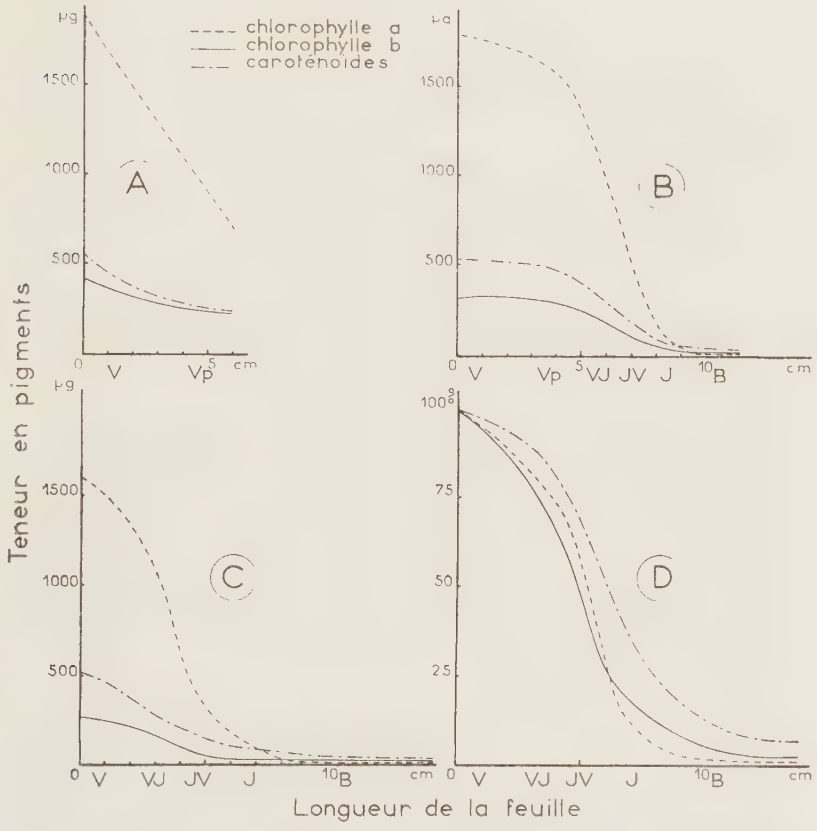


Fig. 15. — Teneur en pigments des diverses régions des trois premières feuilles d'une plantule de Maïs agée de 24 jours, 13 jours après le traitement par 5.10^{-4} d'AAMT.

Les teneurs en pigments de la première (courbes A), de la deuxième (courbes B) et de la troisième feuille (courbes C), sont exprimées en valeurs absolues, en µg de pigments par g de poids frais des feuilles. Par contre, les courbes D représentent les teneurs en pigments des diverses régions de la troisième feuille (exprimées en %) par rapport à celles des régions correspondantes de la feuille de même ordre des plantules témoins.

Les pigmentations des diverses régions des feuilles sont indiquées le long des abscisses : V, région verte ; Vp, vert pâle ; VJ, vert-jaune ; JV, jaune-vert ; J, jaune ; B, blanche.

L'AAMT provoque donc une diminution sensiblement simultanée des deux chlorophylles et une inhibition moins rapide des caroténoïdes. Toutefois cette dernière inhibition est plus importante que celle provoquée par la DSM, ce qui explique l'aspect plus dépigmenté des plantules traitées par l'AAMT. Enfin, contrairement à la DSM, cette substance provoque l'apparition de caroténoïdes nouveaux qui paraissent remplacer progressivement le β-carotène.

C. Aminotriazole (AT).

Nous résumerons brièvement les résultats obtenus au cours des analyses qualitative et quantitative que nous avons effectuées sur des plantules.

1) *Analyse qualitative des modifications pigmentaires.*

L'analyse chromatographique des feuilles de plantules traitées par l'AT permet de noter que cette substance, comme l'AAMT, provoque une inhibition de la biosynthèse des pigments normalement présents dans les feuilles et l'apparition de pigments nouveaux, migrant au voisinage du β-carotène, et le remplaçant dans les régions les plus dépigmentées.

2) *Analyse quantitative des modifications pigmentaires.*

L'AT provoque, comme l'AAMT, une diminution simultanée de tous les pigments, les caroténoïdes étant moins affectés que les chlorophylles. Toutefois la diminution de la teneur en caroténoïdes (fig. 16) est proportionnellement moins importante que celle provoquée par l'AAMT puisque dans la région blanche on trouve encore 9 à 10 % des caroténoïdes présents dans la région similaire d'une feuille de plantule témoin.

D. Conclusions.

Les analyses qualitatives et quantitatives des pigments foliaires de plantules traitées par la DSM, l'AAMT et l'AT, nous ont montré que, si ces composés induisent des altérations pigmentaires irréversibles et une diminution très importante de la teneur en pigments des feuilles, ils n'agissent pas de manière identique sur la synthèse des pigments.

Alors que la DSM provoque une inhibition relativement progressive des pigments se formant au moment où elle agit, l'AAMT et l'AT agissent plus énergiquement, entraînant une diminution rapide de la teneur en pigments le long des feuilles à coloration dégressive.

D'autre part, la DSM bloque l'élaboration de la chlorophylle *a* plus rapidement que celle de la chlorophylle *b*, tandis que l'AAMT

et l'AT agissent sensiblement simultanément sur les deux chlorophylles.

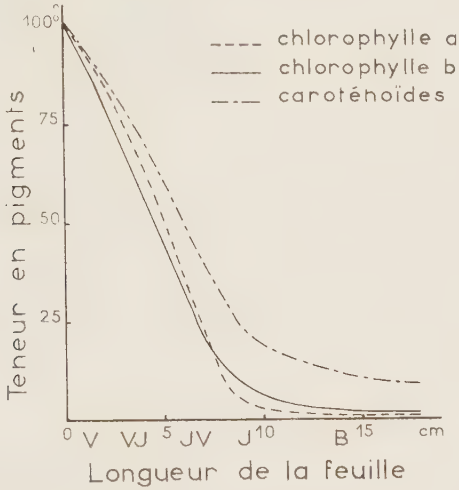


Fig. 16. — Teneur en pigments des diverses régions de la troisième feuille d'une plantule de Maïs de 24 jours, 13 jours après le traitement par 5.10^{-4} d'AT.

Les teneurs en pigments des diverses régions de la troisième feuille sont exprimées en % par rapport à celles de régions correspondantes de la feuille de même ordre de plantules témoins.

La pigmentation des diverses régions de la feuille est indiquée le long des abscisses : V, région verte ; VJ, vert-jaune ; JV, jaune-vert ; J, jaune ; B, blanche.

Enfin, si ces trois substances inhibent la synthèse des caroténoïdes moins rapidement que celle des chlorophylles, elles agissent de manière différente sur cette synthèse. C'est ainsi qu'en présence de DSM, la disparition progressive des caroténoïdes, existant dans les feuilles normalement pigmentées, laisse finalement subsister une quantité importante de β-carotène. Par contre, dans les cas de l'AAMT et l'AT, outre leur action inhibitrice plus importante que celle de la DSM, on assiste à une accumulation de nouveaux caroténoïdes qui remplacent peu à peu le β-carotène dans les régions de moins en moins pigmentées. Les actions de l'AAMT et de l'AT sur la synthèse des pigments sont donc différentes de celles de la DSM.

III. — ESSAIS D'IDENTIFICATION DES NOUVEAUX PIGMENTS APPARUS DANS LES FEUILLES DE MAIS SOUS L'ACTION DE L'ACIDE 3-(α-IMINOETHYL)-5-METHYLTETRONIQUE (AAMT)

En dépit des difficultés signalées dans une mise au point récente de Zechmeister **[230]**, nous avons tenté de préciser la

nature du ou des caroténoïdes nouveaux apparaissant dans les feuilles de Maïs sous l'action de l'AAMT. On sait, en effet, que les différentes formes isomères d'un caroténoïde se transforment facilement et rapidement les unes dans les autres sous l'action de facteurs externes tels que la température, la lumière, etc. Ces transformations sont évidemment accompagnées de variations plus ou moins importantes des propriétés physiques du caroténoïde considéré : spectre d'absorption, point de fusion, etc., ce qui rend très difficile son identification. Aussi envisageons-nous cette question avec d'autant plus de prudence que nous ne disposons que de quantités très faibles de ces composés particuliers.

Nous avons travaillé sur du matériel provenant de régions jaunes et blanches de feuilles de plantules traitées vingt jours auparavant par une concentration de 5.10^{-4} d'AAMT. Après extraction à l'acétone, les pigments totaux sont transférés dans l'éther

TABLEAU VI

Séparation par chromatographie sur colonne de magnésie - Hyflosupercel des pigments nouveaux apparus dans les feuilles de Maïs sous l'action de 5.10^{-4} d'AAMT. Chaque zone est caractérisée par son épaisseur et sa couleur. Dans la colonne de droite figurent les longueurs d'onde d'absorption maximale du pigment, dissous dans l'éther de pétrole léger, provenant de la zone.

ZONE	HAUTEUR (en mm)	COULEUR	maximums d'absorption dans l'éther de pétrole léger (en mμ)
1	15	incolore	
2	8	rouge pourpre	446.473.504
3	40	incolore	
4	2	jaune	436.466
5	3	incolore	
6	3	jaune pâle	425.450.476
7	3	incolore	
8	3	jaune franc	428.457.485
9	reste 60	incolore	

de pétrole, puis l'extrait brut est chromatographié sur papier dans un récipient de grande dimension, en augmentant la longueur de développement pour obtenir une meilleure séparation, plus particulièrement des régions frontales.

Seuls sont recueillis les pigments qui migrent avec le front de solvant à la place ou au voisinage du β-carotène. Dans ces conditions, on constate que ceux-ci forment alors deux bandes étroites accolées, l'une jaune franc, qui migre avec le front, et l'autre, jaune orangé, qui la suit immédiatement. Ces deux bandes sont éluées

simultanément avec de l'éther de pétrole, puis saponifiées par de la potasse normale pendant 24 heures à 22°, à l'obscurité. Après lavage, l'insaponifiable est repris dans l'éther de pétrole puis chromatographié sur une colonne de magnésie Hyflosupercel 1 : 1 (colonne de 150 × 5 mm). Après développement à l'éther de pétrole léger additionné de 1 % d'acétone, la colonne présente l'aspect décrit dans le tableau VI.

Fig. 17. — Spectres d'absorption, dans l'éther de pétrole léger, des pigments nouveaux apparus dans les feuilles de plantules de Maïs traitées par 5.10^{-4} d'AAMT.

L'examen de ce tableau montre qu'il est donc possible d'isoler au moins quatre pigments, par chromatographie sur colonne de magnésie des régions jaune et jaune orangé obtenues par chromatographie sur papier. Ceux-ci, après élution dans l'éther de pétrole léger, donnent les spectres d'absorption représentés sur la figure 17. Les maximums d'absorption de chacun des composés figurent d'autre part dans la colonne de droite du tableau VI.

Le pigment de la zone 2 présente une courbe d'absorption dont le tracé et la longueur d'onde du maximum permettent de penser

qu'il s'agit du lycopène ou d'un de ses isomères (fig. 17 A). Un mélange de ce pigment avec du lycopène extrait de Tomate n'a pu être divisé par chromatographie sur colonne, ce qui renforce notre opinion. Cependant, la présence d'un *cis*-pic à 362 mμ montre que l'on ne se trouve pas en présence de la seule forme « all-*trans* ». Il ne nous est d'autre part pas possible de préciser si le composé « *cis* » existe dans les tissus de feuilles traitées ou si cette transformation est intervenue au cours de l'extraction et de l'analyse.

Quant à la zone 4, le spectre d'absorption du pigment qui est présent en très faible quantité, montre un maximum étendu de 436 à 466 mμ (fig. 17 D). Le tracé de ce spectre est voisin de ceux que donnent certains poly*cis*-lycopènes ou le néo-déhydro-β-carotène J [231]. L'absence de structure fine du maximum de la courbe peut également indiquer que l'on ne se trouve pas en présence d'un corps pur.

Les composés extraits des zones 6 et 8 présentent des spectres d'absorption très voisins (fig. 17 B, C). La forme de ces courbes et la longueur d'onde des maximums permettent de les rapprocher de celui du δ-carotène [65].

Il est certain que cette tentative de séparation et d'identification, qui nous a paru, par ailleurs, à la limite du cadre de notre sujet, ne nous conduit, en fait, qu'à des présomptions. Provisoirement, on peut cependant conclure que quatre nouveaux caroténoïdes au moins s'accumulent dans les feuilles de plantules de Maïs traitées par l'AAMT. Le plus abondant d'entre eux appartient vraisemblablement au groupe du lycopène et comprend des formes « *cis* » qui seraient peut-être d'origine biologique. Deux autres seraient voisins du δ-carotène, et, enfin, le dernier, présent en très faible quantité, pourrait être, soit un isomère du β-carotène, soit un mélange de poly*cis*-lycopènes. Les résultats très fragmentaires ainsi obtenus montrent cependant l'intérêt que pourraient présenter de telles expériences pour l'étude de la biosynthèse des caroténoïdes.

IV. — RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Après avoir montré, dans une étude préliminaire, quels étaient les principaux pigments présents dans les feuilles de plantules de Maïs et les variations possibles de leur concentration suivant la région de la feuille, l'ordre de celle-ci ou son âge, nous avons ensuite mis en évidence les modifications pigmentaires provoquées par la DSM, l'AAMT et l'AT. Bien que les altérations apparues en présence des diverses substances présentent de nombreux traits communs, elles n'en diffèrent pas moins par certains points particuliers qu'il convient maintenant de rassembler et de souligner.

Si la DSM, l'AAMT et l'AT à 5.10^{-4} induisent tous les trois une inhibition simultanée et irréversible de l'ensemble des pigments foliaires, et si cette inhibition intervient plus rapidement sur les chlorophylles que sur les caroténoïdes, la DSM produit une altération de la pigmentation beaucoup plus progressive que celle induite par les deux autres substances.

D'autre part, la DSM provoque une diminution plus importante de la teneur en chlorophylle *a* que de celle en chlorophylle *b*, alors qu'avec l'AAMT et l'AT, on observe, dans les régions encore relativement pigmentées, un parallélisme certain entre le comportement des deux chlorophylles.

Enfin, et c'est là la différence essentielle, la DSM ne bloque jamais, même dans les régions qui apparaissent totalement dépigmentées, la formation de β-carotène. Tel n'est pas le cas pour l'AAMT et l'AT, en présence desquels ce caroténoïde disparaît totalement. De plus, avec ces deux substances, on assiste à l'apparition d'au moins quatre caroténoïdes nouveaux, dont le plus abondant d'entre eux appartiendrait au groupe du lycopène.

CHAPITRE III

ETUDE EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE DES MODIFICATIONS CYTOLOGIQUES INDUITES PAR DIVERSES SUBSTANCES ANTIBIOTIQUES OU ANTICHLOROPHYLLIENNES

Parallèlement aux recherches qui viennent d'être exposées, nous avons cherché à préciser les modifications cytologiques, et plus particulièrement celles affectant les plastes, dans le but de les relier, éventuellement, aux altérations pigmentaires observées. L'ensemble des résultats obtenus constitue le troisième chapitre de nos recherches personnelles.

Nous envisagerons d'abord les modifications induites chez divers végétaux par la dihydrostreptomycine, puis celles provoquées, plus particulièrement chez l'Orge et le Maïs, par certains des autres agents antichlorophylliens.

I. — ACTION DE LA DIHYDROSTREPTOMYCINE (DSM)

A. Végétaux supérieurs.

Nous examinerons successivement les résultats obtenus, d'une part, avec des végétaux entiers (Orge et Maïs, Pois), et, d'autre part, avec des cultures de tissus.

Les échantillons prélevés sur les divers types de matériels sont systématiquement fixés, le matin, après trois heures d'éclairement.

1) *Végétaux entiers.*

a. Orge et Maïs.

Au cours d'une première série d'expériences, nous avons fixé des échantillons, provenant de feuilles correspondantes, de plantules d'Orge de 30 jours, normales ou issues de graines ayant été immergées pendant 24 heures dans une solution de DSM à la concentration de 10^{-3} et présentant des modifications pigmentaires caractéristiques (fig. 2).

L'examen des coupes pratiquées chez les plantules témoins montre, que, quelle que soit la feuille ou la partie de feuille diffé-

renciée observée, les cellules du mésophylle présentent des chloroplastes ovoïdes mesurant environ 5 × 4 × 2 μ. L'hématoxyline et la fuchsine leur confèrent une coloration homogène. Dans ces conditions de fixation, on n'observe pas d'amidon à l'intérieur des chloroplastes.

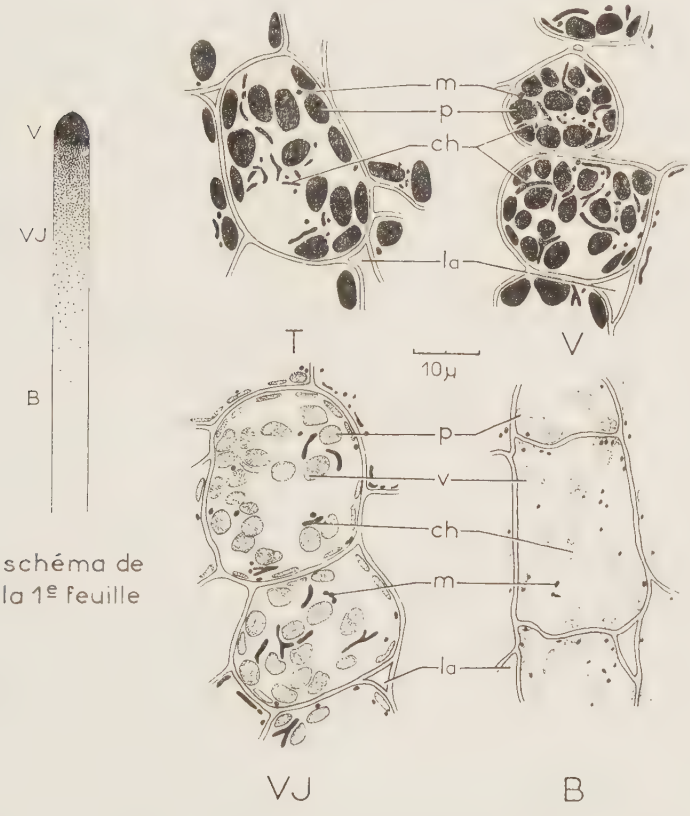


Fig. 18. — Réactions cytologiques induites par la DSM dans le mésophylle de plantules d'Orge provenant de graines traitées par une concentration de 10^{-3} d'antibiotique.

Schéma de la première feuille de plantules provenant de graines traitées ; l'intensité de la pigmentation décroissant depuis la pointe verte (V) jusqu'à la base blanche (B), est représentée par une teinte plus ou moins foncée (VJ), région de pigmentation vert-jaune.

T, V, VJ, B : cellules de mésophylle observées dans les feuilles de plantules témoins (T) ou dans les régions diversement pigmentées de la première feuille des plantules traitées par une concentration de 10^{-3} de DSM (V, VJ, B).

ch, chondriocontes ; la, lacunes ; m, mitochondries ; p, plastes ; v, vésicules.

Les chondriosomes sont représentés par des mitochondries granuleuses de 1 à 1,5 μ de diamètre et des chondriocontes pouvant atteindre 10 μ de long (fig. 18, T).

Chez les plantules traitées, la première feuille est particulièrement intéressante, car elle présente, ainsi que nous l'avons vu précédemment (p. 52), une coloration passant progressivement du vert normal au blanc presque pur.

Dans ce cas, à quelques millimètres de la pointe, dans la région verte, les cellules du mésophylle présentent des chloroplastes et des chondriosomes semblables à ceux des témoins (fig. 18, V). A 15 mm de cette pointe, dans la zone où l'intensité de la pigmentation commence à diminuer, on remarque, en même temps qu'une très légère diminution de la taille des chloroplastes, un changement de leur structure, caractérisé par une tendance à la vésiculisation. Les vésicules ne se colorent pas et, d'autre part, la matière plastidiale a perdu un peu de sa chromaticité. Par contre, les chondriosomes ne semblent pas altérés.

Dix millimètres plus bas, dans la région vert-jaune, on constate que la taille des chloroplastes a légèrement diminué et que l'altération de leur structure s'accentue ; les phénomènes de vésiculisation sont alors plus marqués, les plastes acquérant un aspect « spongieux », et la substance plastidiale ne retient plus que faiblement le colorant (fig. 18, VJ). Enfin, à ce niveau, on commence à déceler une légère perte de chromaticité des chondriosomes ; ces altérations gagnent encore en intensité dans les régions jaunes.

Enfin, dans les régions qui apparaissent entièrement dépigmentées, à 35 ou 40 mm de la pointe, les plastes ne peuvent plus être distingués qu'au microscope à contraste de phase ou par surcoloration des préparations, ce que l'on obtient en augmentant le temps de séjour dans le colorant et en différenciant rapidement, lors de la coloration par l'hématoxyline, ou en chauffant longtemps les coupes dans le cas de la fuchsine. Leur forme est alors irrégulière et leur taille réduite ($4 \times 2 \times 1$ μ). Ils présentent toujours une ou plusieurs vésicules non colorables, paraissent très déformables et s'agglomèrent souvent en amas. Les chondriosomes, par contre, sont moins profondément altérés car leur chromaticité reste toujours plus accentuée que celle des plastes. On note, toutefois, que les mitochondries sont plus nombreuses que dans les cellules observées aux niveaux précédents, tandis que les chondriocontes sont rares et toujours très courts (fig. 18, B).

L'aspect des cellules de la deuxième et de la troisième feuille est identique à celui décrit ci-dessus, et, ici encore, les chondriosomes sont moins altérés que les plastes. Par contre, dans les quatrième et cinquième feuilles normalement pigmentées, apparaissant

ensuite, les deux types d'organites présentent à nouveau une structure normale.

D'autre part, les modifications cytologiques observées quand on traite, par la DSM à la concentration de 10^{-3}, des plantules à différents moments de leur développement, soit avant, soit pendant, soit après la germination, sont identiques à celles obtenues par trempage des graines.

Signalons enfin qu'une étude parallèle des remaniements induits par la DSM, chez le Maïs, a permis de mettre en évidence une complète identité de réactions entre ce matériel et l'Orge.

La DSM provoque donc, parallèlement aux altérations pigmentaires déjà décrites, une modification irréversible de la structure des chloroplastes, caractérisée par une vésiculisation qui s'accompagne d'une diminution de leur taille. D'autre part, la perte de chromaticité de ces organites indique que ces altérations morphologiques sont la conséquence de modifications de leur constitution. Il ne s'agit donc pas d'une simple régression des plastes à l'état de leucoplastes, comme l'ont affirmé Von Euler et coll. [42].

Les chondriosomes, par contre, semblent plus résistants à l'action de la DSM, car leur perte de chromaticité est moins accusée que celle des chloroplastes. La seule autre altération qu'ils manifestent semble consister en une fragmentation partielle des chondriocontes en particules élémentaires, et en fait, les mitochondries granuleuses sont plus nombreuses dans les régions altérées par la DSM.

Ces observations, rapprochées de celles concernant les modifications pigmentaires, suggèrent que les troubles de la pigmentation résulteraient d'une inhibition irréversible de l'édification des plastes, l'antibiotique intervenant au moment de leur différenciation, et non de leur multiplication. En effet, l'apparition de feuilles vertes après la suppression de la DSM ne peut s'expliquer qu'à la condition d'admettre que les plastes continuent à se multiplier dans les cellules méristématiques sans pouvoir se différencier, la différenciation n'étant susceptible de reprendre qu'après la levée de l'inhibition.

De plus, les plastes existant ou présentant déjà un début de différenciation au moment du traitement ne seraient pas altérés, ou resteraient susceptibles d'achever cette différenciation.

En résumé, il semble que chez l'Orge et le Maïs, la DSM ne manifeste son action qu'au moment de la différenciation des plastes. Cette action serait irréversible et entraînerait une dégénérescence des éléments touchés, incapables de subir une évolution normale.

b. Pois.

Les coupes pratiquées dans les feuilles de plantules témoins de Pois et dans les parties vertes de plantules traitées de manière analogue à l'Orge, montrent que les cellules normales de mésophylle

contiennent de nombreux chloroplastes lenticulaires mesurant environ 4 × 3 × 1 μ. L'hématoxyline et la fuchsine leur confèrent une coloration homogène. Dans le cytoplasme on observe de nombreuses mitochondries de 0,7 μ environ qu'accompagnent quelques chondriocontes (fig. 19, V).

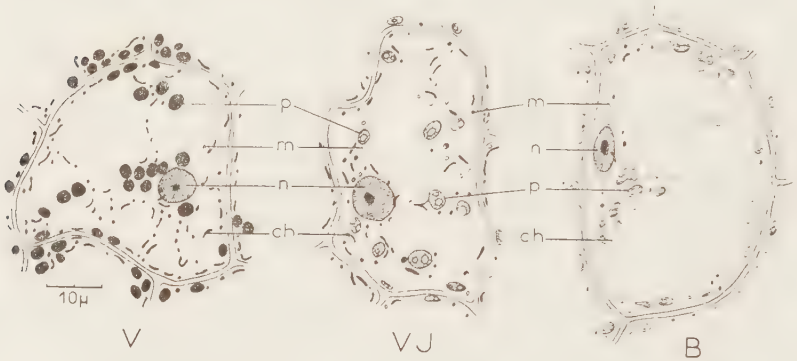


Fig. 19. — Modifications cytologiques induites par la DSM dans le mésophylle de plantules de Pois issues de graines traitées par une concentration de 10^{-3} de DSM.

V : cellules de mésophylle observées dans les plantules témoins ou dans les régions normalement pigmentées des plantules traitées. — VJ : cellules de mésophylle observées dans les feuilles vert-jaune des plantules traitées. — B : cellules des régions les plus dépigmentées des feuilles traitées. — ch, chondriocontes ; m, mitochondries ; n, noyau ; p, plastes.

Si l'on examine maintenant les cellules du mésophylle d'une feuille vert-jaune, on observe alors une légère diminution de la taille des chloroplastes en même temps que ceux-ci deviennent moins colorables et qu'ils présentent, chacun, une vésicule incolore. A ce stade, le chondriome paraît encore tout à fait normal (fig. 19, VJ).

Par contre, dans les parties blanches des plantules, les plastes, dont la taille moyenne a nettement diminué (2,5 × 1,5 × 0,7 μ), n'ont plus de forme définie et deviennent difficiles à distinguer. A ce moment, en effet, la fuchsine ou l'hématoxyline ne les colorent plus que très faiblement. Ils présentent, de plus, une ou plusieurs vésicules. Quant au chondriome, les altérations qu'il présente ont consisté, d'une part en une fragmentation de la quasi-totalité des chondriocontes en mitochondries, et, d'autre part, en la perte d'une partie importante de sa chromaticité (fig. 19, B).

Par ailleurs, ainsi que nous l'avons déjà signalé, dans le cas de l'Orge, les feuilles vertes se formant sur des plantules de Pois après action de la DSM possèdent un équipement cellulaire tout à fait normal.

La DSM induit donc, chez le Pois, des modifications plastidiales analogues à celles que l'on observe chez l'Orge ou le Maïs, et qui sont caractérisées par une diminution de la taille des chloroplastes, une vésiculisation de ceux-ci, s'accompagnant d'une perte de chromaticité. Ici encore, les chondriosomes semblent moins altérables que les plastes.

2) *Cultures de tissus.*

a. Tissus de Carotte.

Nous avons mentionné, dans la première partie de nos recherches, que la souche de tissus de Carotte isolée par GAUTHERET était particulièrement sensible à l'action de la DSM, et que l'on y obtient plutôt des nécroses que des modifications pigmentaires nettes. Ces observations sont confirmées par l'examen cytologique qui permet de déceler un état subléthal de l'ensemble des cellules des colonies tissulaires, et l'on n'observe pas ici de modifications cytologiques caractéristiques de l'action de l'antibiotique.

b. *Tissus de parenchyme vasculaire de Topinambour.*

Nous envisagerons tout d'abord les modifications cytologiques qui se produisent dans le parenchyme vasculaire, lors de l'ensemencement primaire de l'explantat, soit sur le milieu de base seul, soit en présence d'une concentration de 10^{-3} de DSM. Nous indiquerons ensuite les transformations que l'on peut observer après le premier repiquage lorsque la souche s'établit.

α. *Modifications observées dans les explantats primaires.* Il faut tout d'abord rappeler que le parenchyme vasculaire du rhizome, très homogène, est constitué de grandes cellules différenciées, pourvues d'une vacuole unique. Dans le cytoplasme pariétal, avec le noyau, se trouvent des leucoplastes amiboïdes pouvant atteindre 15 μ de long et 1,5 μ de large, contenant généralement une ou deux granulations très chromophiles de 0,5 à 0,7 μ. Aucun de ces organites ne contient de chlorophylle, comme le montre un examen en lumière ultraviolette. Quant au chondriome, il est représenté par de très nombreuses mitochondries de 0,5 μ et de courts chondriocontes de 3 à 5 μ (fig. 20, R).

On sait que si l'on cultive des fragments de ce parenchyme sur milieu de base additionné d'auxine et à la lumière, seule la partie périphérique des explantats, en contact avec le milieu de culture, prolifère pour donner naissance à un cal, les régions centrales n'étant le siège d'aucun remaniement anatomique [**54**].

Envisageons successivement l'évolution subie par les plastes dans le tissu préexistant (P), ne proliférant pas, puis celle qui intervient lors de l'établissement du cambium périphérique (C) et de la formation du cal à partir de ce cambium.

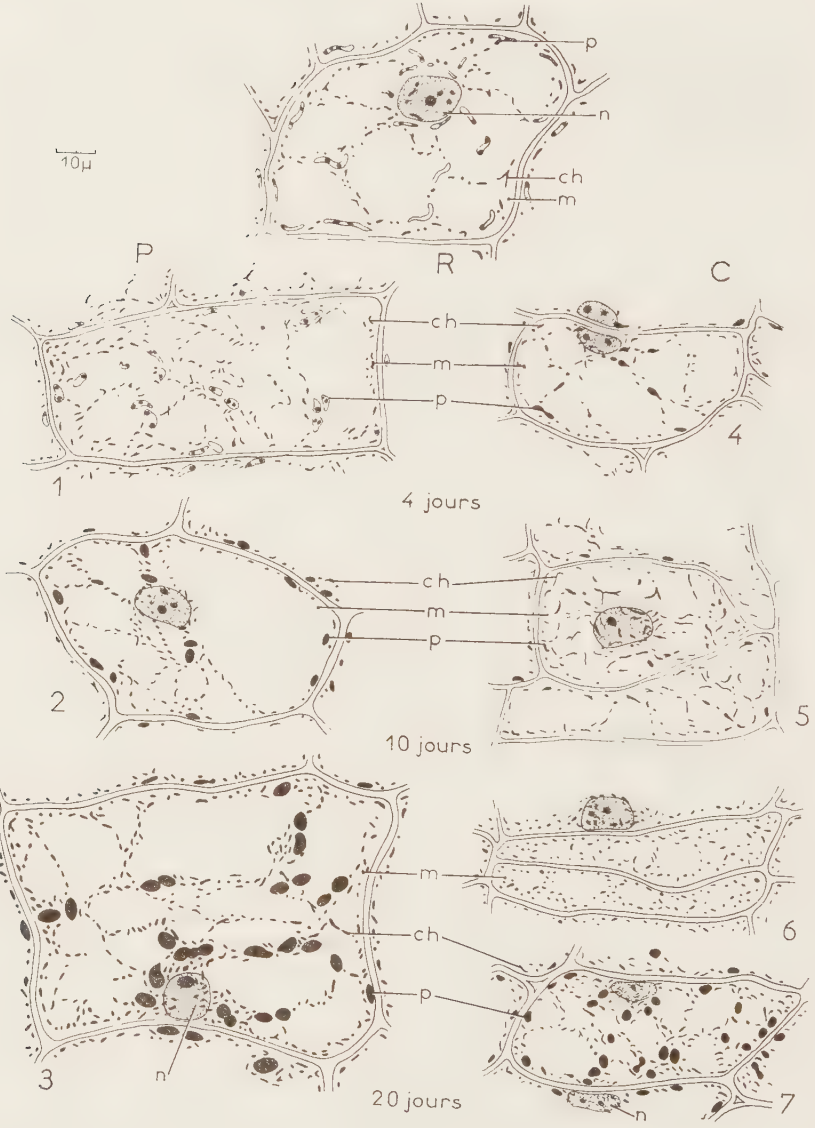


Fig. 20. — Evolution des plastes dans les cellules du parenchyme vasculaire de rhizome de Topinambour cultivé *in vitro* à la lumière.
R : cellule de l'explantat prélevé dans le rhizome de Topinambour. — P (1, 2, 3) : évolution des plastes dans le tissu préexistant, non proliférant, de l'explantat, 4, 10 et 20 jours après la mise en culture ; C (4, 5, 6, 7) : évolution des plastes, 4, 10 et 20 jours après l'ensemencement, dans les cellules périphériques de l'explantat, se dédifférenciant en cambium, puis se différenciant à nouveau pour donner un cal de tissu néoformé.
ch, chondriocontes ; m, mitochondries ; n, noyau ; p, plastes.

Dans la région P, on observe tout d'abord, quatre jours après la mise en culture, un raccourcissement des leucoplastes, tandis que la granulation qu'ils contiennent grossit et atteint 1 μ (fig. 20, P, 1). Six jours plus tard, ces plastes possèdent alors une forme ovoïde presque régulière, et leur taille s'est accrue pour atteindre 4 × 3 × 2 μ (fig. 20, P, 2). Vingt jours enfin après la mise en culture, ils ont acquis leur taille définitive (5 × 4 × 3 μ) et présentent alors un aspect lenticulaire (fig. 20, P, 3). Parallèlement à ces modifications morphologiques, on note, *in vivo*, l'apparition de chlorophylle qui devient décelable en lumière ultraviolette dans les 48 heures après l'ensemencement. A ce moment, le pigment paraît rassemblé dans une granulation confondue, semble-t-il, avec l'une de celles que l'on distingue après coloration sur les coupes fixées. La quantité de chlorophylle augmente ensuite, et dix jours après l'ensemencement, la fluorescence paraît concentrée en trois ou quatre points répartis dans le plaste. L'augmentation de la quantité de chlorophylle s'accélère ensuite rapidement, et, au bout de 20 jours, l'ensemble du plaste est fluorescent.

Dans la région C, les premières mitoses qui donneront naissance au cambium deviennent visibles quatre jours après l'ensemencement. A ce moment, les leucoplastes, qui présentent également des figures de division, possèdent encore parfois une granulation chromophile de 1 μ environ (fig. 20, C, 4). Six jours plus tard, le cambium s'individualise et la taille des plastes y a encore diminué (1,5 × 1 μ) comme le montre la figure 20, C, 5. Enfin, dix jours plus tard, les cellules cambiales ne contiennent plus que des organites semblant tous appartenir au chondriome et constitués par des granulations de 0,5 à 0,7 μ (fig. 20, C, 6).

Mais, à ce moment, des éléments cellulaires provenant du fonctionnement de l'assise cambiale, sont déjà en cours de différenciation (fig. 20, C, 7). Les cellules dans cette situation contiennent alors des chloroplastes ovoïdes de 3 × 4 × 2,5 μ, ainsi que des mitochondries et des chondriocontes normaux, ces derniers atteignant des longueurs de 3 à 5 μ.

D'autre part, si, aux tous premiers stades de la dédifférenciation, après 48 heures de culture, l'examen en lumière ultraviolette permet de déceler la présence de chlorophylle dans chaque plaste, sous forme d'une petite granulation fluorescente rouge, le pigment disparaît rapidement lors des stades suivants de la dédifférenciation, en particulier dans les cellules cambiales où il est impossible de distinguer les plastes des mitochondries. Par contre, après 20 jours de culture, la chlorophylle réapparaît sous forme de quelques granulations dans les jeunes chloroplastes, au sein des cellules du cal qui se différencient à nouveau. Le pigment se répartit ensuite dans

tout le chloroplaste lorsque la différenciation de celui-ci est terminée.

On assiste donc, lors de la mise en culture et du développement du parenchyme vasculaire de Topinambour, à une transformation des leucoplastes en chloroplastes. Cette transformation peut suivre deux voies différentes. Dans les tissus non proliférants (P), constituant la partie centrale de l'explantat, les leucoplastes se transforment directement en chloroplastes, tandis que, dans les cellules des régions périphériques (C) qui se dédifférencient, se recloisonnent et donnent un cambium engendrant le tissu néoformé du cal, les leucoplastes régressent d'abord, reviennent à l'état indifférencié dans le cambium, puis se différencient à nouveau en donnant des chloroplastes dans les cellules du cal.

Examinons maintenant, pour chacune des régions P et C, les perturbations que provoque la concentration de 10^{-3} de DSM additionnée au milieu de culture des explantats primaires.

En ce qui concerne le tissu non proliférant (P) la DSM ne provoque aucune modification visible après 4 jours de culture. Par contre, 6 jours plus tard, on assiste à un blocage de la différenciation des plastes, celle-ci s'arrêtant souvent à un stade intermédiaire entre celui de leucoplaste amiboïde et de chloroplaste lenticulaire. Les organites plastidiaux, qui restent dans cet état même après 30 ou 40 jours de culture, présentent alors en leur sein une ou plusieurs granulations chromophiles (fig. 21, P).

D'autre part, la DSM n'empêche pas la formation de chlorophylle au cours des premiers stades stades de l'évolution. C'est ainsi qu'après 48 heures, le pigment paraît rassemblé en un granule fluorescent lors de l'examen en lumière ultraviolette. Quelques jours plus tard, apparaissent trois ou quatre plages chlorophylliennes à l'intérieur du plaste. A ce stade, la synthèse du pigment se bloque, et quelle que soit la durée ultérieure de la culture, les plastes n'acquièrent jamais une coloration verte homogène.

Quant à la région C, les dix premiers jours de culture n'apportent aucune modification dans le processus de dédifférenciation des plastes. Par contre, dix jours plus tard, on constate que les éléments qui se différencient, ne contiennent que des petits plastes ovoïdes (2 à 3 $\mu \times 2, 5\ \mu$) peu chromophiles et vésiculisés. C'est d'ailleurs le stade final de leur évolution, quelle que soit la durée pendant laquelle l'explantat est maintenu au contact du milieu de culture.

D'autre part, à part quelques îlots aberrants formés en général de quelques cellules contenant des plastes un peu plus différenciés et qui manifestent une légère fluorescence rouge en lumière ultraviolette, on n'observe jamais de chlorophylle dans les cellules de cette zone.

Enfin, qu'il s'agisse du cambium ou des cellules provenant de celui-ci, le chondriome observé dans cette région ne comporte, en général, que des mitochondries de 0,5 à 0,7 μ de diamètre. Ici encore, celles-ci sont moins colorables que les éléments normaux et moins colorables également que ceux des cellules de la région P.

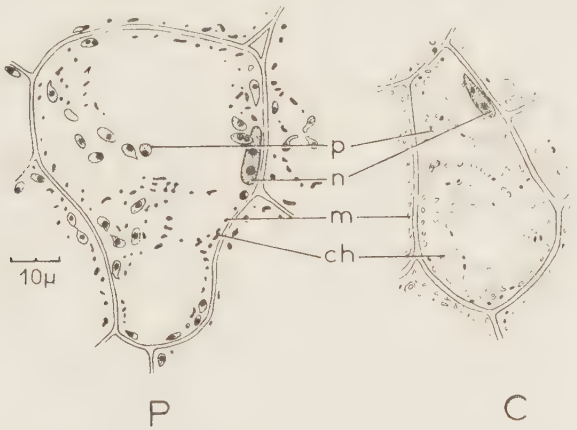


Fig. 21. — Modifications de l'évolution des plastes dans les cellules de parenchyme vasculaire de rhizome de Topinambour cultivé *in vitro*, à la lumière, en présence d'une concentration de 10^{-3} de DSM.
P : cellule du tissu préexistant, 20 jours après l'ensemencement. — C : cellule du tissu néoformé du cal, 20 jours après l'ensemencement. — ch, condriocontes ; m, mitochondries ; n, noyau ; p, plastes.

En résumé, nous avons pu constater que dans la région P des explantats, la DSM ne bloque que partiellement la transformation des leucoplastes en chloroplastes (fig. 22) et la synthèse de la chlorophylle, tandis que, dans la région C, si elle n'empêche pas la formation et la multiplication des proplastes, elle bloque très rapidement la différenciation des plastes des tissus néoformés et l'élaboration intraplastidiale de la chlorophylle (fig. 22). Ajoutons, de plus, que le chondriome des cellules différenciées de cette dernière région présente des altérations, ce qui n'est pas le cas des organites similaires de la zone P.

β. *Modifications observées au cours de l'établissement de la souche dépigmentée.* Nous avons indiqué, dans le premier chapitre de ce mémoire, qu'après avoir prélevé les tissus néoformés C des explantats traités par la DSM à la concentration de 10^{-3}, on pouvait voir se développer, après repiquage sur milieu de base sans DSM, des colonies panachées. Il semble que les nodules chlorophylliens de telles colonies trouvent leur origine dans les îlots de cellules encore légèrement chlorophylliennes dont nous venons de signaler ci-dessus l'existence.

Comparons maintenant les structures cytologiques de la souche totalement dépigmentée que nous avons obtenue à celles d'une souche normale, également cultivée sur milieu de base additionné de 20 % de son volume de lait de coco, condition nécessaire à un développement rapide des tissus incolores. Alors que la souche normale, provenant du repiquage de cals prélevés sur les explantats

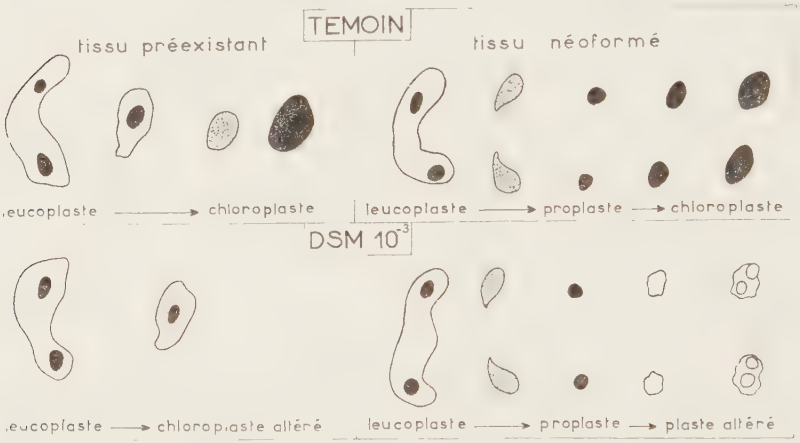


Fig. 22. — Représentation schématique de l'évolution des plastes dans le parenchyme vasculaire de Topinambour cultivé *in vitro*, à la lumière, sur milieu de base seul (témoin), ou additionné d'une concentration de 10^{-3} de DSM.
Tissu préexistant : tissu non proliférant constituant la partie centrale de l'explantat ; tissu néoformé : cambium et cal résultant de la prolifération des cellules périphériques de l'explantat.

non traités par la DSM, possède des cellules avec de gros chloroplastes lenticulaires de 5 × 3 × 2 μ et un chondriome normal (fig. 23, V), la souche dépigmentée provenant des explantats traités par la DSM, ne contient, dans ses cellules, (fig. 23, B) que quelques plastes dégénérés, très peu colorables, de forme irrégulière, de petite taille (2 × 1,5 × 1 μ), et contenant une ou deux vésicules incolores. Ces organites ne montrent, par ailleurs, aucune fluorescence en lumière ultraviolette. Quant au chondriome des tissus dépigmentés, il a perdu une grande partie de sa chromaticité.

γ. *Conclusions.* La DSM agissant à la lumière sur des explantats de parenchyme vasculaire de Topinambour cultivés *in vitro* provoque, d'une part, une inhibition partielle de la différenciation et de la chlorophyllogenèse des plastes des tissus préexistants, et d'autre part, une inhibition totale de la chlorophyllogenèse et partielle de la différenciation des plastes des tissus néoformés du

cal. De plus, elle ne semble pas bloquer la division des proplastes dans le cambium néoformé car, dans les cellules de la souche blanche obtenue, on trouve des organites que l'on peut considérer comme des plastes dégénérés.

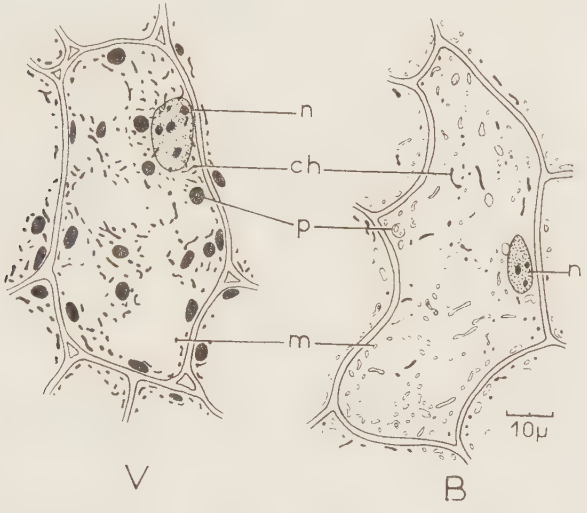


Fig. 23. — Cellules différenciées du parenchyme des souches normale et dépigmentée de tissus de Topinambour cultivés *in vitro*, à la lumière sur milieu de base additionné de 20 % de son volume de lait de coco.

V : cellule d'une souche normalement pigmentée. — B : cellule d'une souche dépigmentée. — ch, chondriocontes ; m, mitochondries ; n, noyau ; p, plaste.

On peut se demander si l'action limitée de la DSM sur les tissus préexistants n'est pas due à une diffusion limitée de l'antibiotique au travers des tissus de l'explantat. Dans les conditions actuelles de nos recherches, il ne nous est pas possible d'apporter de solution à ce problème.

3) *Résumé.*

L'action que la DSM exerce sur les plastes de végétaux supérieurs peut se résumer ainsi :

1. la DSM freine partiellement la différenciation des plastes indifférenciés des méristèmes (proplastes) et, corrélativement, inhibe la synthèse de la chlorophylle. Elle ne semble pas agir, par contre, sur la multiplication des plastes puisque, dans de nombreux cas, des proplastes néoformés peuvent se différencier en chloroplastes dès que son action cesse ;

2. les chloroplastes différenciés avant l'application de la DSM ne sont pas altérés par l'antibiotique ;

3. la DSM semble n'agir sur le chondriome qu'à forte dose et après un temps de contact prolongé. Les modifications observées paraissent toujours beaucoup moins importantes que celles observées sur les plastes. Ces dernières observations cytologiques devraient, pour être affirmées, être étayées par des études du métabolisme respiratoire des tissus traités.

B. Végétaux inférieurs.

Il était intéressant, parvenu à ce point de nos recherches, d'étudier le comportement des chloroplastes ou chromatophores de végétaux inférieurs, dont certains organes se multiplient sans faire retour à un état indifférencié.

Nous étudierons principalement les modifications induites par la DSM sur les prothalles de Fougères, puis sur quelques Algues.

1) *Prothalles de Fougères.*

Des prothalles de *Gymnogramme calomelanos* ont été cultivés, ainsi qu'il a été précisé dans l'exposé de la première partie de nos recherches, sur milieu de base additionné ou non de diverses doses de DSM.

Les prothalles développés sur milieu normal présentent, dans les cellules des régions en voie de croissance de la partie supérieure des explantats, de gros chloroplastes ovoïdes de $8 \times 5 \times 4$ µ contenant chacun plusieurs grains d'amidon et se divisant par allongement et étranglement. Le chondriome est représenté par des mitochondries de 0,5 µ environ et de courts chondriocontes de 3 à 4 µ de long (fig. 24, T). La base des explantats, en contact avec le milieu, présente, surtout dans les colonies âgées, des cellules en voie de dégénérescence analogues à celles que l'on observe chez les prothalles placés dans de mauvaises conditions physiologiques [**68**, **196**]. Les chloroplastes de ces cellules sont fortement altérés. Aussi doit-on éliminer ces régions lors du prélèvement des échantillons.

Ainsi que nous l'avons vu précédemment (p. 66), les modifications produites par la DSM varient beaucoup selon la concentration.

A la concentration de 10^{-3}, l'action de la DSM provoque, d'une manière générale, après 45 jours de culture, une réduction certaine de la taille des chloroplastes qui ne mesurent plus que $6 \times 4 \times 2$ µ environ. Ceux-ci ne possèdent alors qu'un ou deux grains d'amidon, souvent rejetés latéralement, donnant parfois, à la substance plastidiale, l'aspect d'un croissant (fig. 24, 10^{-3}). Dans certains cas, on peut, d'autre part, observer des plastes rubannés présentant des

étranglements, et dans lesquels les grains d'amidon sont très réduits. Le chondriome n'est pas modifié.

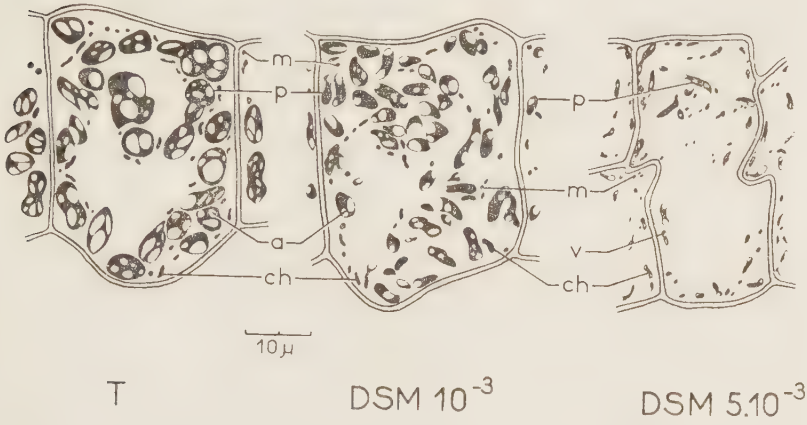


Fig. 24. — Modifications cytologiques induites par la DSM dans les cellules de prothalles de *Gymnogramme calomelanos* cultivés *in vitro*, à la lumière. T : cellule de prothalle témoin cultivé sur milieu de base seul. — DSM 10^{-3} : cellule de prothalle cultivé sur milieu de base additionné d'antibiotique à la concentration de 10^{-3}. — DSM 5.10^{-3} : modifications cellulaires observées dans les cellules de prothalles cultivés en présence de 5.10^{-3} d'antibiotique. — a, amidon ; ch, chondriocontes ; m, mitochondries ; p, plastes ; v, vésicules.

Si l'on augmente la dose de DSM jusqu'à 5.10^{-3}, on observe alors, dans les parties incolores des prothalles, une altération considérable des plastes qui se traduit, en premier lieu, par une diminution de taille, accompagnée d'une vésiculisation, les plus gros éléments mesurant 3×4 µ sur 0,7 µ, alors que les plus petits ($1,5 \times 0,7$ µ) peuvent être confondus avec les chondriosomes (fig. 24, 5.10^{-3}). D'autre part, les vésicules apparues ne contiennent pas d'amidon. La substance plastidiale peut donc prendre l'aspect de chondriosomes, mais la régression n'est toutefois pas accompagnée d'une perte de chromaticité comme dans le cas des végétaux supérieurs.

Aucune de ces altérations apparues en présence d'antibiotique ne présente, soulignons-le encore, d'analogie avec les figures de dégénérescence qui se produisent dans la base des colonies âgées, avant que ne s'installent des phénomènes de nécrose.

Les observations effectuées en lumière ultraviolette nous ont montré que, en présence de 10^{-3} de DSM, on ne trouve plus, dans les plastes présentant les altérations que nous venons de décrire, que quelques grana faiblement fluorescents, alors que, dans les

chloroplastes des prothalles développés sans antibiotique, ces organites intraplastidiaux, très nombreux, sont intensément fluorescents. Signalons enfin que, dans les plastes dégénérés, observés dans les régions non pigmentées des prothalles cultivés en présence d'une concentration de 5.10^{-3} de DSM, on ne peut déceler de chlorophylle.

La DSM aux concentrations égales ou supérieures à 10^{-3} provoque donc, dans les prothalles de *Gymnogramme*, une inhibition simultanée de la synthèse de la chlorophylle et de l'élaboration de la substance plastidiale. D'une manière générale, ses modalités d'action sur les Fougères sont donc identiques à celles qu'exerce l'antibiotique sur les végétaux supérieurs. Il convient, cependant, de remarquer qu'un examen plus approfondi du détail des processus en cause, montre qu'il existe de profondes différences de comportement entre les chloroplastes des deux catégories d'organismes. En effet alors que, chez les végétaux supérieurs, les proplastes altérés par la DSM restent susceptibles de grandir sans atteindre pour cela une taille normale, il n'en est pas de même dans le cas de prothalles de Fougères. D'autre part, les plastes altérés de ces derniers organes conservent une chromaticité normale, contrairement à ce que l'on observe dans le cas de l'Orge, du Maïs ou du Pois.

2) *Autres végétaux inférieurs.*

Il ne nous a pas été possible d'observer de modifications des chloroplastes de Sphaignes sous l'action de la DSM. Nous avons vu en effet que ce matériel biologique, très sensible à l'action de l'antibiotique, se nécrose et meurt avant que l'on observe une altération de la pigmentation.

Il en est de même chez les *Chlamydomonas* bien que, dans ce cas, les fortes doses de DSM, ne provoquent pas d'altération visible de la pigmentation, ainsi que nous l'avons montré précédemment. Nous avons pu constater que cette résistance est liée au maintien de la structure du chromatophore.

Par contre, dans la souche dépigmentée d'Euglènes, obtenue ainsi qu'il l'a été indiqué précédemment, on observe de profondes altérations des chromatophores. Alors que chez les témoins (fig. 25, V), ces organites sont très volumineux ($10 \times 6 \times 2$ µ), on ne trouve plus, dans la souche blanche, que de très petits plastes altérés ($2 \times 1 \times 1$ µ), peu colorables, quelquefois vésiculisés (fig. 25, B). Ceux-ci ne peuvent être assimilés à des leucoplastes, comme le fait De Deken-Grenson [28], car ils ne se colorent pratiquement plus par les réactifs habituels des plastes.

3) *Résumé.*

Chez les végétaux inférieurs, les réactions plastidiales à l'action de la DSM sont donc très variées, tout en suivant la règle générale :

à toute modification pigmentaire correspond une altération plastidiale et, inversement, les cellules normalement pigmentées ne contiennent pas de plastes altérés. La résistance à l'antibiotique varie selon les groupes ou les espèces. Alors que de fortes altérations des plastes sont faciles à obtenir chez certains (Euglènes), on ne les provoque que difficilement chez d'autres (prothalles de Fougères), et il est impossible, parfois, de déceler la moindre réaction *(Chlamydomonas)*.

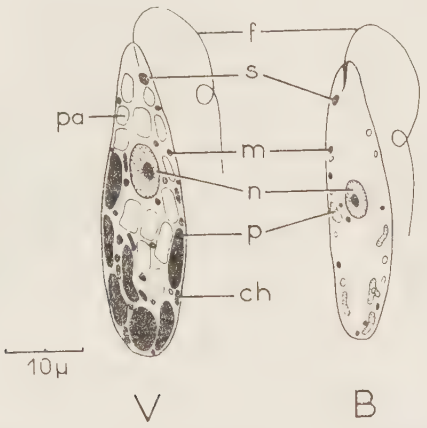


Fig. 25. — Modifications cytologiques induites chez *Euglena gracilis* par la DSM.

V : Euglène normalement pigmentée. — B : Euglène non pigmentée provenant du traitement de la souche par une concentration de 10^{-3} de DSM. — ch, chondriocontes ; f, flagelle ; m, mitochondries ; n, noyau ; p, plastes ; pa, paramylon ; s, stigma.

D'autre part, alors que certaines réactions sont voisines de celles observées chez les végétaux supérieurs (Euglènes), d'autres semblent s'en écarter (prothalles de Fougères). Enfin la chlorophylle ne paraît pas jouer dans certains cas (Euglènes, prothalles) un rôle protecteur contre l'action de la DSM, contrairement à l'opinion émise par Dusi en 1953 [**34**].

C. Résumé et conclusions.

Au cours de nos observations nous avons donc constaté que, chez les végétaux supérieurs, la DSM n'altère pas les chloroplastes différenciés, n'empêche pas la multiplication des plastes dédifférenciés (proplastes) des méristèmes, mais, par contre, inhibe définitivement la différenciation normale des proplastes. Ces derniers, en présence d'antibiotique, peuvent grandir et atteindre une taille

proche de la normale: mais ils sont alors vésiculisés et ne contiennent pas de substance plastidiale colorable par les réactifs habituels de ces organites.

Chez les végétaux inférieurs, dont les chloroplastes ou chromatophores se multiplient sans se dédifférencier, la DSM provoque une diminution irréversible très importante de la taille de ces organites qui deviennent parfois presque indistincts des chondriosomes.

Il est cependant permis de penser que les diverses actions de la DSM, telles qu'elles ont été décrites, ne sont pas fondamentalement différentes les unes des autres, si l'on admet que, d'une part, l'antibiotique agit sur la synthèse de la substance plastidiale, mais n'intervient pas dans le processus de multiplication, et d'autre part, que la substance plastidiale est indispensable à la synthèse de la chlorophylle. Une telle hypothèse permet d'interpréter la plupart des faits observés, expliquant notamment pourquoi les chloroplastes différenciés des végétaux supérieurs, qui ne se multiplient pas, sont insensibles à l'action de la DSM, tandis que ceux des végétaux inférieurs, qui se multiplient dans les mêmes conditions, sans qu'intervienne toutefois aucune synthèse de substance plastidiale, diminuent rapidement de taille.

II. — ACTION D'AUTRES SUBSTANCES

Nous examinerons ensuite les modifications cytologiques induites, principalement chez l'Orge et le Maïs, par les diverses substances dont nous avons étudié l'action sur la croissance et la pigmentation de ces plantules. Nous envisagerons d'abord l'action de l'AAMT que l'on sait provoquer des modifications pigmentaires différentes de celles de la DSM, puis nous décrirons plus rapidement les altérations engendrées par les autres composés.

A. Acide 3-(α-iminoéthyl)-5-méthyltétronique (AAMT).

Nous avons fixé et coloré, 20 jours après le traitement, des échantillons provenant de feuilles de plantules de Maïs présentant une pigmentation variable sous l'influence d'une dose d'AAMT de 5.10^{-4}, appliquée, soit par pulvérisation sur des plantules de Maïs âgées de huit jours, soit par incorporation au milieu de culture comme il l'a été précédemment décrit.

Dans ces conditions, on constate que, dans les parties normalement pigmentées des plantules, les cellules du mésophylle possèdent, comme chez les témoins, des chloroplastes ovoïdes de $8 \times 5 \times 2$ μ, qui se colorent de manière homogène par la fuchsine et l'hématoxyline. Le chondriome est constitué par des mitochondries granuleuses de 1 μ et des chondriocontes de 8 à 9 μ (fig. 26, T).

Si l'on examine ensuite les régions altérées, on observe alors des modifications importantes de la structure cytologique. C'est ainsi que, dans la deuxième feuille qui était en cours de différenciation lorsque l'AAMT a été appliqué, les plastes diminuent peu à peu de taille, en même temps qu'ils acquièrent des formes irrégulières, au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la pointe verte pour

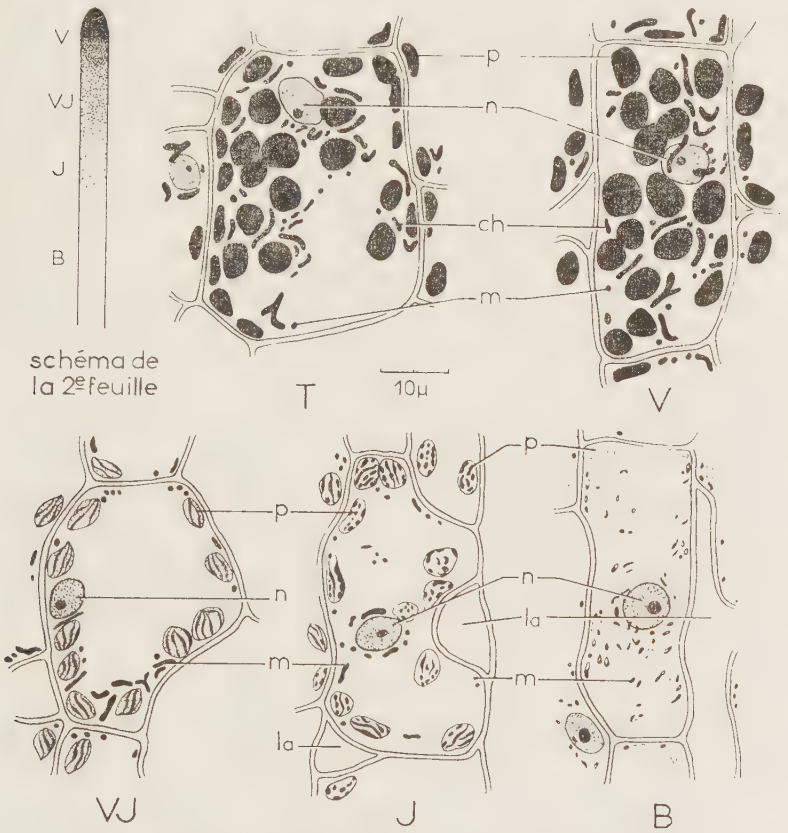


Fig. 26. - Modifications cytologiques induites, dans le mésophylle de plantules de Maïs par une concentration de 5.10^{-4} d'AAMT.

Schéma de la deuxième feuille : la diminution de l'intensité de la pigmentation de la deuxième feuille des plantules traitées, depuis la pointe verte (V) jusqu'à la région non pigmentée (B), est représentée par une teinte plus ou moins foncée ; VJ ; région vert-jaune ; J, jaune.

T : cellule du mésophylle de plantule témoin. — V, VJ, J, B : cellules du mésophylle prélevé dans les régions correspondantes de la deuxième feuille des plantules traitées.

ch, chondriocontes ; la, lacunes ; m, mitochondries ; n, noyau ; p, plastes.

examiner les zones de moins en moins pigmentées (fig. 26). Dès la région VJ, se manifeste de plus une certaine hétérogénéïté de structure qui se traduit par la persistance de bandes et de granulations restées très chromophiles dans des plastes très peu colorés. Dans la région jaune (J), seuls subsistent des granules chromophiles de 0,5 à 1 μ dispersés dans une masse que ne colore plus ni la fuchsine, ni l'hématoxyline. Enfin dans la zone blanche (B) les plastes ont perdu toute chromaticité et sont, de ce fait, difficiles à distinguer. La plupart semblent vésiculisés.

Les modifications des chondriosomes sont beaucoup plus discrètes. On note tout d'abord une diminution de la longueur des chondriocontes (VJ), puis leur fragmentation partielle (J). Enfin les chondriosomes des régions incolores présentent tous une légère perte de chromaticité.

Ces modifications se retrouvent dans toutes les régions à pigmentation anormale, indépendamment du mode de traitement et du rang de la feuille considérée.

Il faut noter, d'autre part, qu'un examen *in vivo*, en lumière ultraviolette, montre que la chlorophylle ne subsiste que dans les structures chromophiles mises en évidence, après fixation et coloration, dans les plastes altérés des régions vert-jaune et jaune.

Enfin, il faut signaler que l'AAMT provoque, chez l'Orge, des modifications cytologiques tout à fait identiques à celles que l'on observe chez le Maïs sous l'action de cette substance.

L'AAMT, comme la DSM, provoque donc des modifications profondes et définitives des plastes en cours de différenciation et des altérations plus discrètes des chondriosomes. Toutefois, cette substance, à l'opposé de la DSM, n'agit pas uniformément sur la totalité du plaste, ce qui se traduit par l'apparition de zones chromophiles dans lesquelles sont fixées les dernières traces de chlorophylle.

B. Autres substances.

Nous ne ferons que mentionner rapidement les résultats de nos observations effectuées sur des plantules traitées par les autres facteurs antichlorophylliens étudiés.

1) *Tétracyclines.*

L'auréomycine et la terramycine, à la concentration de 5.10^{-4}, provoquent, chez l'Orge et le Maïs, des modifications plastidiales tout à fait identiques à celles que provoque la DSM à la concentration de 10^{-3}.

2) *Aminotriazole (AT).*

Les altérations cytologiques, et plus particulièrement plastidiales, que l'on observe dans les feuilles de plantules de Maïs traitées

par l'AT à la dose de 5.10^{-4} sont analogues à celles que produit une dose équivalente d'AAMT.

3) *Pénicilline.*

Nous avons vu antérieurement que la pénicilline, utilisée à la dose de 1 600 000 U.I. par litre, provoque la croissance du parenchyme vasculaire de Topinambour et permet l'obtention d'une souche à prolifération indéfinie. D'autre part, comme nous l'avons

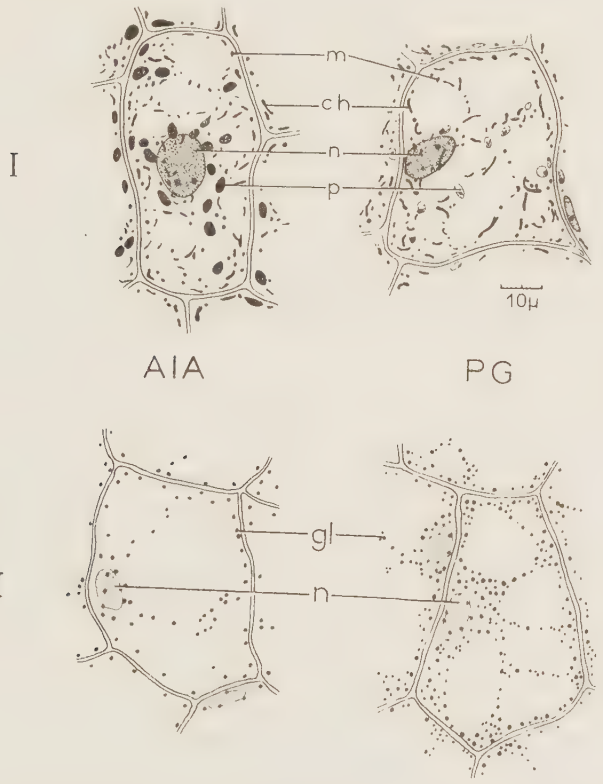


Fig. 27. — Modifications cytologiques induites par la pénicilline G sur une souche de rhizome de Topinambour cultivée *in vitro*, à la lumière.

I : cellules fixées au liquide de Regaud et colorées à la fuchsine. Seuls le chondriome et les plastes ainsi que le noyau sont mis en évidence. — II : cellules fixées au formol-calcium de Baker puis colorées au Noir Soudan. Cette technique ne révèle que les lipides intracellulaires. Le noyau est simplement indiqué. — AIA : cellules différenciées de parenchyme de la souche se développant sur milieu de base contenant comme substance excito-formatrice une concentration de 5.10^{-7} d'acide β indole acétique. — PG : cellules différenciées de parenchyme de la souche se développant sur milieu de base contenant 1.600.000 U.I./litre de pénicilline G comme substance excito-formatrice.

ch, chondriocontes ; gl, globules lipidiques ; m, mitochondries ; n, noyau.

également signalé, la pigmentation de cette souche est plus pâle que celle se développant normalement en présence de 5.10^{-7} d'acide β indole acétique.

L'examen des cellules du parenchyme des colonies cultivées en présence d'antibiotique montre que les chloroplastes qu'elles contiennent (fig. 27, PG), de taille sensiblement équivalente à celle des chloroplastes de colonies cultivées sur milieu contenant de l'acide β indole acétique (fig. 27, AIA), sont cependant moins chromophiles. Seules une ou deux granulations, situées souvent à la périphérie des chloroplastes, se colorent normalement. Les chondriosomes ne sont pas altérés, mais par contre, on trouve, dans le cytoplasme, une grande quantité de gouttelettes lipidiques, tandis que la vacuole des cellules est envahie par une telle quantité de composés phénoliques (composés oxyflavoniques et tannoïdes) qu'il est impossible d'utiliser la coloration à l'hématoxyline.

Signalons, d'autre part, que ces remaniements ne s'observent que dans les tissus de la souche bien établie, et que les cals formés en présence de pénicilline G sur les explantats primaires ou lors du premier repiquage de ceux-ci, présentent une structure cytologique normale, à l'exception toutefois d'une accumulation de substances phénoliques.

C. Résumé et conclusions.

A part la pénicilline, qui ne produit que de très légères altérations des plastes, à forte dose et après un temps d'action très long, toutes les substances étudiées provoquent très rapidement, chez les végétaux, des modifications irréversibles des plastes, qui consistent en une inhibition de la synthèse de substance plastidiale, accompagnée d'un bloquage de la formation des pigments dans les plastes.

D'une manière générale, ces modifications n'atteignent pas les plastes déjà différenciés, et ne semblent pas intervenir dans la multiplication des proplastes des méristèmes.

Tous ces composés, antibiotiques ou antichlorophylliens, ne troublent cependant pas de manière identique l'évolution normale des plastes. Alors que la DSM, l'auréomycine et la terramycine provoquent progressivement une diminution homogène de la chromaticité de ces organites, l'AAMT et l'AT modifient de manière hétérogène la constitution des plastes. A certains stades de dégénérescence, des bandes chromophiles apparaissent dans une masse plastidiale peu colorable. Si l'on aboutit au même résultat final, dans les régions les plus dégradées, le mode d'action de ces deux dernières substances n'en est pas moins différent de celui des précédentes. Ces différences d'action sur la structure des chloroplastes existant entre les deux groupes de composés, DSM et tétracyclines d'une part, AAMT et AT d'autre part, sont à rapprocher de celles observées au cours de l'étude des altérations pigmentaires.

CHAPITRE IV

ÉTUDE CYTOLOGIQUE DE LA DIFFERENCIATION DES CHLOROPLASTES DANS LES PLANTULES DE MAÏS.

Avant de préciser, au cours du dernier chapitre de nos recherches personnelles, les modalités de l'action de certaines substances sur l'ultrastructure des chloroplastes de Maïs, il nous a semblé indispensable, pour essayer d'interpréter cette action, d'analyser, dans le détail, la structure fine de ces chloroplastes et leur mode de différenciation.

Si l'on sait, grâce aux travaux de Hodge et coll. [90], quelle est l'infrastructure des chloroplastes différenciés, ces auteurs [91] n'ont apporté sur les modalités de leur différenciation que des observations fragmentaires, et nous avons déjà indiqué au cours de l'historique de ce travail que, sur ce dernier point, certaines de leurs hypothèses paraissaient devoir être révisées.

Au cours de ce chapitre, nous rappellerons tout d'abord brièvement les données classiques sur la structure fine des chloroplastes différenciés de Maïs, puis nous indiquerons les modalités essentielles de leur différenciation.

I. — STRUCTURE DES CHLOROPLASTES DIFFÉRENCIÉS

Nous avons étudié la structure fine des deux types de plastes présents dans les feuilles de Maïs, en prélevant des échantillons sur des plantules âgées de huit jours et cultivées sur terre, à la lumière. Ce travail nous a permis de confirmer intégralement les résultats de Hodge et coll. [90] en ce qui concerne la structure des organites présents tant dans le parenchyme périvasculaire que dans le tissu lacuneux.

Dans les deux cas, les plastes, approximativement de même dimension d'ailleurs, sont limités par une double membrane de 150 Å d'épaisseur et sont formés d'un stroma granuleux, particulièrement dense dans les régions périphériques, au sein duquel on observe, irrégulièrement disséminés, des globules osmiophiles.

Les plastes du parenchyme lacuneux (Pl. I, fig. 1), ou plastes à grana, présentent un double système lamellaire constitué de grandes lamelles peu nombreuses qui s'étendent en général d'un bout à l'autre du plaste. Ce sont les lamelles intergrana. Celles-ci sont en contact avec d'autres, plus courtes, formées de saccules aplatis, empilés les uns sur les autres, et dont l'ensemble constitue les grana.

Les plastes du parenchyme périvasculaire, ou plastes sans grana, ne contiennent que de grandes lamelles que l'on peut assimiler à des lamelles intergrana, s'étendant d'un bout à l'autre du chloroplaste. La régularité de la disposition des lamelles est perturbée par la présence de nombreuses vésicules amylifères de grande taille (Pl. I, fig. 2).

Dans l'un comme dans l'autre type de plaste, on remarque dans la partie périphérique du stroma ou péristromium, la présence de quatre ou cinq lamelles plus fines, auxquelles Hodge attribue un rôle dans l'édification du système lamellaire du plaste [**91**].

Ainsi donc, nos propres observations confirment celles de nos devanciers en ce qui concerne, d'une manière générale, la structure des deux types de plastes. Il convient cependant de noter ici l'impossibilité dans laquelle nous sommes de partager leur opinion en ce qui concerne les rapports existant entre grana et lamelles intergrana. Alors que pour Hodge et coll. [**90**], les grana seraient formés de la bifurcation de lamelles intergrana, certaines de nos images nous amènent en effet à conclure que les lamelles intergrana sont, en fait, des saccules très allongés, aplatis, pouvant s'étendre d'un bout à l'autre du plaste et s'insérant, au niveau des grana, entre les saccules qui constituent ceux-ci, comme le montre la planche II.

II. — ÉTUDE EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE ET ÉLECTRONIQUE DES PRINCIPAUX STADES DE LA DIFFÉRENCIATION DES CHLOROPLASTES

On sait que, chez les monocotylédones, les feuilles qui se développent possèdent un méristème basal qui fonctionne très longtemps, de telle sorte que l'on peut observer, le long d'une même feuille, à la fois des cellules tout à fait indifférenciées, en voie de multiplication active, et des cellules ayant atteint leur état final de développement. Entre ces deux extrêmes, on rencontre naturellement tous les stades intermédiaires. De plus, à un niveau donné d'une plantule, la différenciation cellulaire est d'autant moins avancée que l'on examine une feuille plus jeune, c'est-à-dire plus interne.

Compte tenu de ces remarques générales, nous avons donc réalisé les études décrites ci-dessous sur des plantules âgées de huit jours et cultivées à la lumière. Ces plantules possèdent alors

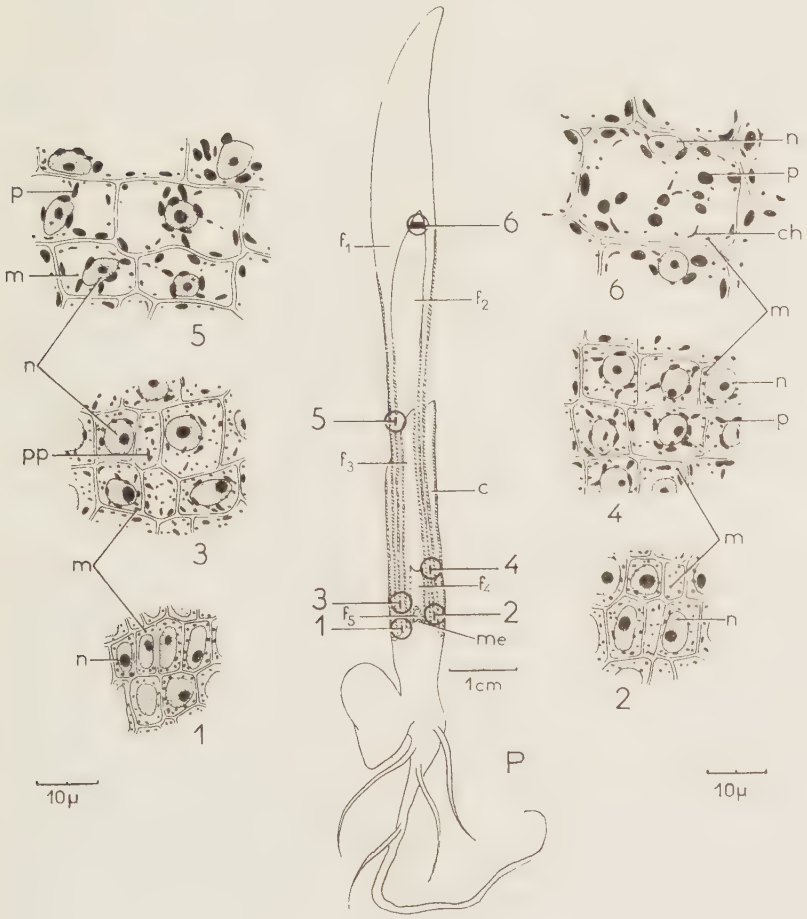


Fig. 28. — Principaux stades de la différenciation des chloroplastes dans la deuxième feuille de plantule de Maïs âgée de huit jours.

P : coupe schématique d'une plantule de Maïs cultivée pendant huit jours à la lumière. — c, coléoptile ; f_1, f_2, f_3, f_4, f_5, feuilles ou ébauches foliaires numérotées selon leur ordre d'apparition ; — me, méristème caulinaire ; 1, 2, 3, 4, 5, 6, niveaux de prélèvement des échantillons le long de la deuxième feuille à partir du méristème basal (l), pris respectivement 2, 4, 8, 30 et 60 mm au-dessus de ce méristème. — 1, 2, 3, 4, 5, 6 : cellules de la deuxième feuille correspondant aux niveaux de prélèvement indiqués sur la plantule P.

ch, chondriocontes ; m, mitochondries ; n, noyau ; p, plastes ; pp, proplastes.

cinq feuilles, à des stades de différenciation variable comme le montre la figure 28, allant depuis l'état d'ébauche méristématique pour la cinquième feuille, jusqu'à un organe dont l'extrémité supérieure est complètement développée pour la première. Comme nous avons, au cours de cette étude, observé que les processus de différenciation étaient identiques, quel que soit l'ordre d'apparition de la feuille étudiée, nous ne rapporterons ici, pour simplifier l'exposé, que les principales étapes de la différenciation observée le long de la deuxième feuille, depuis le méristème basal jusqu'à la pointe parfaitement différenciée.

A. Etude de la différenciation des chloroplastes dans une meme feuille de la base au sommet.

Après avoir indiqué, en partant d'observations réalisées au microscope photonique, les niveaux auxquels les chloroplastes présentent les stades les plus intéressants de leur différenciation, nous préciserons ensuite, pour chacun d'eux, les détails de leur ultrastructure. Enfin, nous rapporterons quelques observations effectuées à l'occasion de cette étude sur l'évolution de la structure fine de quelques autres constituants cellulaires.

1) *Microscopie photonique.*

Nous avons étudié depuis le méristème jusqu'à la pointe de la deuxième feuille, c'est-à-dire sur une longueur totale de 60 mm, la structure des cellules à des niveaux différents, ceux-ci étant beaucoup plus rapprochés les uns des autres dans les régions basales de l'organe que vers la pointe. La localisation des prélèvements, ainsi que les observations concernant chloroplastes et chondriosomes, sont représentés de manière schématique dans la figure 28.

Dans le méristème basal de la feuille (niveau 1), les cellules, en état de multiplication active et complètement indifférenciées, présentent des vacuoles extrêmement réduites, d'une taille souvent inférieure à 1 μ. Elles contiennent, d'autre part, des granulations chromophiles de 0,5 à 0,8 μ de diamètre, parmi lesquelles il est impossible de distinguer les proplastes des mitochondries.

Dès le niveau 2, qui se situe 2 mm plus haut, on observe déjà un certain grandissement cellulaire, un accroissement des vacuoles qui mesurent alors de 1 à 2 μ de diamètre, mais les proplastes restent encore confondus avec les mitochondries.

Ce n'est qu'au niveau immédiatement supérieur (niveau 3), soit à 4 mm environ du méristème, que s'individualisent les proplastes. Ils se présentent alors sous forme d'organites allongés dont la plus grande dimension peut atteindre 2 à 3 μ et qui présentent parfois un aspect en « têtard » en raison du renflement d'une de leurs extrémités.

En s'éloignant encore du méristème, la distinction entre mitochondries et plastes devient de plus en plus facile, dès le niveau 4, dont les cellules contiennent, à côté de 3 ou 4 grosses vacuoles, des plastes atteignant 3 ou 4 μ de longueur, alors que la taille des mitochondries ne dépasse pas 1 μ. A ce niveau, situé à 8 mm de la base, la différenciation des diverses régions de la feuille est d'ailleurs plus ou moins poussée selon que les cellules considérées évolueront en parenchyme ou donneront naissance aux faisceaux cribro-vasculaires.

L'évolution se poursuit ensuite jusqu'à la pointe de la feuille (niveaux 5 et 6). Parvenus à leur terme normal dans les conditions de l'expérience, les plastes du mésophylle ont alors pratiquement atteint leur taille définitive (5 à 7 μ × 4 × 3). La différenciation de ces organites semble cependant un peu moins avancée le long des faisceaux cribro-vasculaires. Qu'il s'agisse du niveau 5 ou du niveau 6, le chondriome s'est par ailleurs différencié en mitochondries et chondriocontes allongés.

Enfin, une observation en lumière ultraviolette montre que, dès le niveau 3, c'est-à-dire dès le moment où l'on peut les distinguer des mitochondries, les plastes observés *in vivo* présentent une fluorescence rouge. Celle-ci va s'accentuant à mesure que l'on observe des niveaux de plus en plus éloignés du méristème.

2) *Microscopie électronique.*

Examinons maintenant, d'abord l'évolution des plastes, puis celle des structures fines des autres territoires cellulaires.

La distinction entre mitochondries et proplastes peut s'effectuer au microscope électronique à un niveau très inférieur à celui précédemment décrit. S'il est difficile d'une manière générale de distinguer les deux types d'organites au niveau 1, il est cependant possible de les identifier lorsqu'ils sont coupés sagittalement (Pl. III, fig. 1). Bien que limités tous deux par une double membrane, bien que de taille sensiblement identique, on constate que les proplastes, d'une part plus pauvres en crêtes que les mitochondries, présentent, d'autre part, une certaine hétérogénéité interne ; ils contiennent, en particulier, des zones plus riches que d'autres en une substance osmiophile finement granuleuse dans lesquelles on remarque parfois de rares vésicules, de formes variables, limitées par une membrane de 20 à 30 Å d'épaisseur. Ces vésicules se forment par invagination du feuillet interne de la double membrane limitante. Les régions internes des mitochondries sont toujours, par contre, perméables aux électrons.

Dès le niveau 2, les proplastes se distinguent, à coup sûr, des mitochondries (Pl. III, fig. 2). Ces dernières n'ont guère changé d'aspect et sont toujours pauvres en crêtes. Quant aux proplastes,

on constate qu'ils présentent souvent des vésicules dans un stroma dont l'opacité aux électrons est légèrement augmentée. De plus, on peut constater que la taille de ces derniers organites est légèrement supérieure à celle des mitochondries et que leur forme est parfois irrégulière. A ce même niveau, signalons que l'on remarque souvent des figures de division des deux types d'organites, division qui s'effectue par allongement, étranglement et séparation des deux moitiés après étirement.

A partir du niveau 3, on constate un alignement et parfois même une soudure entre les vésicules engendrées dans les proplastes par le feuillet interne de la double membrane limitante, le stroma étant toujours relativement opaque aux électrons (Pl. IV, fig. 1 et 2). A ce stade de la différenciation, il n'est pas rare de trouver, dans des cellules voisines et quelquefois même, dans une même cellule, des plastes présentant des figures d'organisation interne légèrement différentes.

Au niveau suivant, la soudure des vésicules alignées s'est considérablement accrue et l'on observe alors des saccules aplatis dont certains s'étendent d'un bout à l'autre du plaste, tandis que d'autres, plus courts, s'empilent les uns sur les autres (Pl. V, Pl. VI, fig. 1 et Pl. VII, fig. 1). Les premières vont constituer les lamelles intergrana, ou lamelles de stroma, tandis que les secondes formeront les grana. La formation des deux types de saccules peut être simultanée ou successive, et il semble n'exister aucune règle en fixant l'ordre. Il est en effet possible d'observer des proplastes possédant déjà plusieurs saccules de stroma avec de rares ébauches de grana (Pl. VI, fig. 1), alors que, chez d'autres, plusieurs grana sont différenciés sans que l'on note la présence de lamelles intergrana (Pl. IV, fig. 2). A ce stade de leur développement, on observe quelquefois, à l'intérieur des proplastes, la présence d'un grain d'amidon entouré d'une chaînette de vésicules (Pl. VII, fig. 2).

Au niveau 5, la structure lamellaire interne des plastes du mésophylle est très développée : on y observe des grana formés par l'empilement de trois à cinq saccules aplatis de même longueur (Pl. VIII, fig. 1) et plusieurs lamelles intergrana sur lesquelles sont placés, sans ordre apparent, les divers grana.

Quant aux plastes des cellules contigües aux vaisseaux en voie de formation, ils apparaissent, à ce niveau, plus petits que ceux du mésophylle et ne possèdent encore que quelques longues lamelles s'étendant d'un bout à l'autre du stroma.

Enfin, au niveau 6, la différenciation des chloroplastes du mésophylle est pratiquement terminée (Pl. IX, fig. 1). Il ne leur manque plus que quelques saccules de grana et quelques lamelles intergrana ; reste, d'autre part, à atteindre l'alignement régulier des grana qui caractérise les chloroplastes totalement différenciés.

Des globules osmiophiles sont en général visibles entre les lamelles du stroma.

Le long des faisceaux vasculaires, les chloroplastes, de taille souvent inférieure à ceux du mésophylle, présentent alors de longues lamelles identiques aux lamelles intergrana (Pl. IX, fig. 2). Sur le trajet de ces lamelles, on observe parfois quelques petits saccules accolés qui font alors penser à une ébauche de grana. A ce stade encore juvénile, on n'y observe pas les nombreuses vésicules amylifères que l'on trouve chez ces mêmes plastes lorsque leur différenciation est achevée.

***

Examinons maintenant rapidement l'évolution des structures fines des autres territoires cellulaires. En ce qui concerne les mitochondries dont nous avons signalé antérieurement qu'elles restaient pauvres en crêtes, jusqu'au niveau 3, on observe, dans les stades ultérieurs, une augmentation du nombre et de la longueur des invaginations du feuillet interne de la double membrane à mesure que s'accentue la différenciation (Pl. VIII, fig. 2). Lorsque celle-ci est terminée, on constate que les crêtes sont anastomosées et donnent aux mitochondries un aspect réticulé caractéristique. De plus, certaines d'entre elles se sont allongées et forment des chondriocontes.

Quant aux grains de Palade, leur densité semble varier également chez le Maïs avec le degré d'évolution de la cellule. Ces formations se rencontrent ici surtout dans le cytoplasme des cellules et ne paraissent pas systématiquement liées aux feuillets ergastoplasmiques. Très nombreux dans les niveaux 1, 2, 3 et 4, on constate d'autre part que leur nombre diminue à mesure que s'accentue la différenciation cellulaire. Enfin, signalons que l'on trouve, dans le nucléole des noyaux interphasiques des cellules peu différenciées (niveau 1, 2 et 3), des particules très osmiophiles de 200 à 250 Å qui ont déjà été signalées chez d'autres végétaux, ces particules semblent être absentes du noyau des cellules différenciées (Pl. V).

***

En résumé, nous avons pu constater qu'entre les régions méristématiques de la base de la deuxième feuille et sa pointe différenciée, la structure fine des divers organites cellulaires subit de profonds remaniements. Si les grains de Palade semblent être moins nombreux, si les vacuoles grossissent et fusionnent, et si les mitochondries montrent des crêtes plus nombreuses dans les cellules en cours de différenciation, les modifications les plus profondes sont certaine-

ment celles affectant les proplastes. Entre ceux des régions méristématiques, non structurés, très difficiles à distinguer des mitochondries, et les chloroplastes pratiquement différenciés de la pointe de la feuille, on observe tous les stades intermédiaires possibles de l'édification du système lamellaire interne du plaste. Ces lamelles ne sont en fait que des saccules aplatis. Elles se forment, ainsi que Hodge et coll. [**91**] l'ont déjà indiqué, par alignement et coalescence de vésicules provenant d'invaginations du feuillet interne de la double membrane limitant le proplaste.

Les saccules aplatis peuvent devenir très grands et s'étendre d'un bout à l'autre du plaste pour constituer les lamelles de stroma, ou bien rester limités en longueur, se disposer les uns sur les autres, et édifier alors les grana. Le déterminisme de cette spécialisation nous échappe. Par contre, dans les cellules du parenchyme périvasculaire, où seules les lamelles de stroma se développent, cette spécialisation de certains saccules, qui commencent à s'ébaucher dans le jeune chloroplaste, semble ensuite inhibée.

Il ne nous a pas été possible de déceler dans le plaste, au cours de son évolution, de « prolamellar body », auquel Hodge [**89**, **91**] assigne le rôle d'initiateur du système lamellaire interne. Toutefois certaines de nos observations nous ont amené à formuler l'hypothèse que des variations du mode de développement des plastes pouvaient être possibles au cours de la journée.

B. Variations du processus de différenciation des plastes au cours de la journée.

Afin de vérifier la valeur de cette hypothèse, des échantillons prélevés sur des plantules de Maïs de huit jours, aux niveaux indiqués ci-dessus, sont fixés, soit à la fin de la période obscure (6 h du matin, temps 0), soit après 4, 8 ou 12 heures d'éclairement.

L'examen des coupes pratiquées dans ces échantillons permet de constater que les proplastes, au maximum de leur dédifférenciation (niveau 1) ne renferment jamais de « promellar body » ou « primärgranum » quelles qu'aient été les conditions de lumière ou d'obscurité au moment du prélèvement (Pl. X, fig. 1).

Par contre, lorsque les plastes appartiennent à des cellules au début de leur différenciation, les observations effectuées sont profondément différentes selon que la fixation a été pratiquée à la fin de la période obscure ou après des temps d'éclairement variables.

Nous ne rapporterons, pour simplifier, que les observations effectuées le long de la deuxième feuille que nous avons étudiée précédemment.

Au temps 0, les proplastes de cellules du niveau 2 renferment un amas de vésicules qui ne présentent pas, comme Hodge l'a affirmé, un caractère pseudo-cristallin (Pl. X, fig. 2). Cet amas,

formé d'éléments de 200 à 300 Å, souvent anastomosés en réseau, occupe en général le centre des proplastes. Dans les cellules un peu plus différenciées du niveau 3, cet amas est souvent situé à une extrémité du plaste et en relation avec des lamelles en voie d'édification (Pl. XI, fig. 1 et 2). Enfin au niveau 4, dans les plastes qui possèdent déjà un système lamellaire différencié, on n'observe plus, aux extrémités des lamelles, que quelques rares vésicules groupées (Pl. XII, fig. 1).

Après quatre heures d'éclairement, l'infrastructure des proplastes en début de différenciation s'est profondément modifiée. Au niveau 3, par exemple, on constate une réduction extrêmement importante du volume du granum primaire qui s'accompagne de l'édification de lamelles par alignement et coalescence des vésicules qui le composent (Pl. XII, fig. 2). Dans certains plastes, il a même déjà complètement disparu.

Enfin les proplastes de plantules ayant subi un éclairement de 8 à 12 heures ne présentent pas de granum primaire, quel que soit le niveau considéré. Il faut mentionner qu'après de telles durées d'éclairement, le nombre et la taille des vésicules amylifères augmentent considérablement dans les plastes sans grana différenciés au niveau 6. Il devient alors possible d'en observer également entre les lamelles de stroma des plastes à grana. La taille des globules osmioréducteurs des plastes semble évoluer dans le même sens.

En conclusion, le granum primaire n'est décelable, chez le Maïs, que pendant une courte période, après l'interruption de l'obscurité, dans les proplastes présentant un début de différenciation. On peut penser que les vésicules formées pendant la nuit s'y accumulent sous forme de granum primaire, puis, dès le début de la période lumineuse, s'orientent très rapidement. Elles fusionnent ensuite pour former des lamelles, de manière analogue à celle décrite par Hodge et coll. [**91**] dans le cas de feuilles de Maïs étiolées placées à la lumière. Par contre, lorsque le système lamellaire est suffisamment développé, les vésicules édifiées pendant les phases obscures suivantes s'accolent directement aux lamelles existantes sans former de granum primaire.

C. Résumé et conclusions.

Nous avons donc pu, confirmant les travaux de Hodge et coll. [**90**], identifier la présence de chloroplastes à grana dans le mésophylle des feuilles de plantules de Maïs et de chloroplastes sans grana dans le parenchyme périvasculaire.

L'étude du processus de différenciation des plastes nous a permis de confirmer le rôle que Hodge et coll. [**89**, **91**] assignaient à la membrane limitante du plaste et de vérifier que le feuillet interne émet, par invagination, des vésicules dont la coalescence permet

l'édification du système lamellaire du plaste. Cependant, contrairement aux affirmations de Hodge et coll., les premiers stades de cette édification n'ont pas pour origine un « prolamellar body », qui n'est qu'une structure transitoire liée à une lumière insuffisante.

D'autre part, nos observations nous ont amené à des conclusions différentes de celles de ces auteurs en ce qui concerne les relations existant entre les lamelles intergrana et les grana. Les figures observées au cours de la formation du système lamellaire, montrent l'indépendance existant entre les longs saccules aplatis des lamelles intergrana, et ceux plus courts des grana : les uns étant simplement accolés aux autres, et se différenciant sans ordre défini, semble-t-il, suivant un processus et un déterminisme qui nous échappe actuellement.

Nous avons enfin signalé que l'apparition de chlorophylle semble liée à la formation des premières lamelles à l'intérieur du proplaste.

CHAPITRE V

ÉTUDE AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE DES MODIFICATIONS DE L'ULTRASTRUCTURE PLASTIDIALE INDUITES PAR LA DIHYDROSTREPTOMYCINE (DSM). ET L'ACIDE 3-(α-IMINOETHYL)-5-MÉTHYLTÉTRONIQUE (AAMT).

Nous avons indiqué précédemment, dans le chapitre concernant l'analyse des pigments foliaires, que les substances antichlorophylliennes expérimentées pouvaient se répartir en deux grands groupes dotés de propriétés bien différentes. La DSM et l'AAMT peuventê tre considérés comme les représentants de chacun de ces groupes et, dans le but de tenter d'approfondir leur mode d'action, nous avons étudié l'influence de ces deux composés sur l'ultrastructure des chloroplastes de Maïs.

Pour cette étude, nous avons prélevé des échantillons sur des plantules âgées de 20 jours, 11 jours après le traitement par une concentration de 5.10^{-4} de la substance à étudier incorporée au milieu de culture ainsi que nous l'avons indiqué ci-dessus (p. 81). Nous avons fixé, simultanément, d'autre part, les régions correspondantes de feuilles de plantules normales, développées dans les mêmes conditions.

Nous rapporterons ici les modifications de l'ultrastructure cellulaire observées le long de la deuxième feuille des plantules, matériel dans lequel nous avons déjà étudié les altérations des pigments et celles des chloroplastes en microscopie photonique, ainsi que l'évolution de la différenciation normale des plastes.

I. — ACTION DE LA DIHYDROSTREPTOMYCINE (DSM)

Nous indiquerons d'abord les modifications plastidiales observées puis nous mentionnerons les altérations éventuellement présentées par les autres territoires cellulaires.

L'ensemble de nos observations concernant les plastes est résumé dans les schémas de la figure 29.

L'examen de ces schémas montre que, dans les régions à pigmentation normale des plantules traitées, les chloroplastes ont une

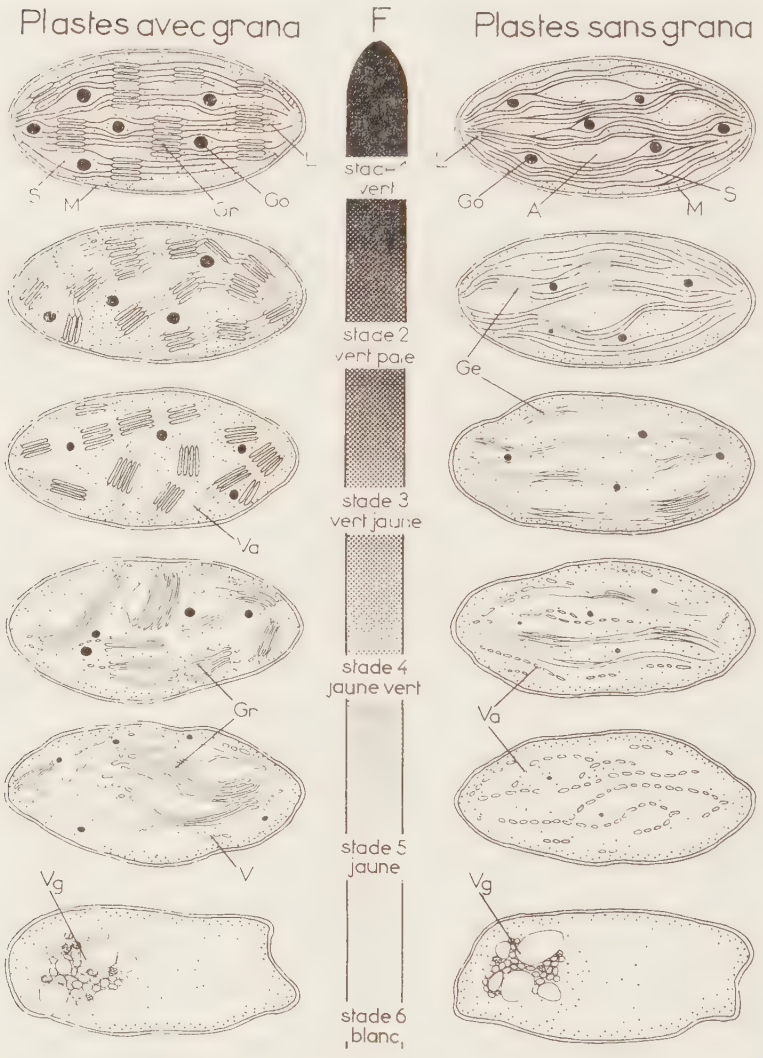


Fig. 29. — Schéma des modifications de l'ultrastructure des chloroplastes des feuilles de Maïs induites par la DSM.

F : schéma de la deuxième feuille d'une plantule traitée : l'intensité de la pigmentation diminuant depuis la pointe verte (stade 1) jusqu'à la région non pigmentée (stade 6), est représentée par une teinte plus ou moins foncée. A gauche de la feuille, modifications des plastes à grana ; à droite, modifications des plastes sans grana.

A, amidon ; Ge, granum embryonnaire ; Go, globules osmiophiles ; Gr, granum ; L, lamelles intergrana ou lamelles de stroma ; M, membrane double limitant le plaste ; V, vésicules ; Va, vésicules alignées ; Vg, vésicules groupées en amas.

structure identique à celle que l'on observe chez les témoins (fig. 29, stade 1). Par contre, dès la région vert pâle des feuilles, les premières modifications se manifestent.

Dans cette zone (fig. 29, stade 2), les plastes à grana présentent de fréquentes ruptures des lamelles intergrana (Pl. XIII, fig. 1), ce qui entraîne une disposition irrégulière des grana. Ceux-ci ne sont toutefois pas altérés (Pl. XIII, fig. 2). Ces modifications s'accentuent dans la région vert-jaune (fig. 29, stade 3) ; les lamelles intergrana y sont réduites à des chaînettes de vésicules, sauf en quelques endroits, au voisinage de certains grana, où l'on observe encore quelques vestiges de lamelles. Les grana, moins nombreux, souvent formés d'un grand nombre de saccules, sont alors dispersés de manière anarchique dans le stroma (Pl. XIV et Pl. XV, fig. 1). Il semble donc que l'on assiste ici à une exaltation de la formation des saccules des grana. En effet, si le nombre des grana a diminué dans chaque plaste, chacun d'eux est constitué par une quantité importante de saccules, de taille souvent supérieure à la normale, de telle sorte qu'à l'intérieur du plaste considéré le nombre total de ces saccules est augmenté. Au stade 4 (fig. 29) ces mêmes plastes, souvent déformés, ne montrent plus que quelques groupes de saccules, en général volumineux et dilatés (Pl. XV, fig. 2). De petites vésicules dispersées dans le stroma sont les seuls vestiges de lamelles intergrana. Dans la région jaune (stade 5) on ne trouve plus qu'un ou deux grana très aberrants formés de saccules très allongés et plus ou moins dilatés et des vésicules dispersées dans le stroma (Pl. XVI, fig. 1). Enfin, dans les parties dépigmentées des feuilles (stade 6), les plastes ne contiennent plus qu'un amas de vésicules de tailles variées dont certaines, de nature inconnue, sont osmiophiles. Le reste du plaste, hormis la membrane, ne diffracte pas les électrons (Pl. XVI, fig. 2).

Les plastes sans grana des mêmes régions subissent une évolution parallèle et dès la région vert pâle (stade 2) on constate que le nombre des lamelles diminue (Pl. XVII, fig. 1). Simultanément, apparaissent, le long de certaines d'entre elles, des structures discrètes rappelant des ébauches de grana. Ces modifications sont plus importantes encore au stade suivant (fig. 29, stade 3). A ce niveau, les plastes ne renferment plus que quelques longues lamelles sur le trajet desquelles on observe des ébauches de grana (Pl. XVII, fig. 2). Au stade 4, certaines lamelles sont remplacées par des chaînettes de vésicules, tandis que, dans la région jaune (stade 5), on ne trouve plus que quelques vésicules souvent alignées. Enfin, dans les régions blanches (stade 6), on ne peut distinguer les plastes sans grana, altérés, de l'autre type de plaste car tous deux possèdent la même structure.

Dans ces deux types de plastes, on constate que le nombre et la taille des globules osmiophiles n'ont cessé de diminuer depuis les régions vert pâle jusqu'aux régions blanches. Quant à l'amidon, il a pratiquement disparu des plastes sans grana, dès qu'une altération s'est manifestée dans la structure de leurs lamelles (stade 2).

D'autre part, le stroma, homogène, finement granuleux dans les plastes normalement pigmentés, devient hétérogène dès que la pigmentation s'altère, des travées granuleuses séparent alors des zones restées plus perméables aux électrons. Ces zones s'agrandissent au fur et à mesure que la pigmentation s'altère et, dans la région blanche, on n'observe plus qu'une mince couche de stroma à la périphérie du plaste et au voisinage de l'amas de vésicules.

Enfin, il faut remarquer que, quel que soit le degré d'altération qu'ils présentent, les plastes dont la structure est modifiée gardent une taille toujours assez voisine de celle des plastes normaux. De plus, ils restent, dans tous les cas, limités par une double membrane de 150 Å d'épaisseur.

Les autres structures cytoplasmiques présentent aussi des altérations, à des degrés différents d'ailleurs, selon leur nature.

C'est ainsi que les mitochondries qui possèdent de nombreuses crêtes anastomosées dans les cellules des régions normalement pigmentées, perdent une partie de ces crêtes quand la dépigmentation s'accentue et montrent, dans les régions blanches, une ultrastructure rappelant celle des mitochondries à caractère juvénile présentes dans le méristème basal des feuilles. On n'observe pas de chondriocontes dans ces mêmes régions.

Les dictyosomes de l'appareil de Golgi, fort peu nombreux dans le cytoplasme des cellules différenciées normales, semblent avoir disparu de celui des cellules dépigmentées, alors que le réticulum endoplasmique y est encore visible.

Par contre, le cytoplasme des cellules des régions blanches est beaucoup plus riche en grains de Palade osmioréducteurs que celui des cellules normales.

La DSM perturbe donc profondément l'infrastructure de l'ensemble des organites cellulaires. C'est ainsi que les mitochondries, l'appareil de Golgi, sont ou altérés ou détruits par l'antibiotique, alors que des substances osmioréductrices s'accumulent dans le cytoplasme. Les modifications apparues en présence de la DSM semblent d'ailleurs tendre à ramener les structures considérées à ce qu'elles sont normalement dans les cellules les plus méristématiques. Quant aux plastes, si la double membrane qui les limite n'est que peu ou pas modifiée, leur structure est fortement perturbée. C'est le processus d'édification des lamelles de stroma (ou lamelles intergrana) qui semble le plus sensible à l'action de l'antibiotique, alors que la formation des grana n'est troublée que si

l'antibiotique agit tout au début de leur différenciation. Dans ce cas, il n'existe plus d'organisation interne des vésicules émises par la membrane limitante du plaste. Enfin, l'antibiotique inhibe la formation d'amidon, de globules osmioréducteurs, ainsi que l'élaboration de la substance fondamentale, le stroma, à l'intérieur du plaste.

Il faut signaler, de plus, que dans les zones de pigmentation intermédiaire, notamment dans les régions vert pâle et vert-jaune, on assiste à une exaltation de la formation des grana. Etant donné que les jeunes plastes présents dans le méristème, au moment où l'antibiotique a agi, ne possédaient alors que quelques grana pourvus de 3 à 5 saccules chacun, on peut penser que la DSM ne trouble pas instantanément la formation de ces grana et que le système qui contribue à l'édification de ces structures peut continuer à fonctionner un certain temps en présence de la substance.

II. — ACTION DE L'ACIDE 3-(α-IMINOETHYL)-5-METHYLTETRONIQUE (AAMT)

Ici encore, après avoir présenté les modifications plastidiales observées sur le Maïs sous l'action de l'AAMT et qui sont résumées dans les schémas de la figure 30, nous mentionnerons quelques observations se rapportant aux autres organites intracellulaires.

L'examen de cette figure montre que les chloroplastes de la région normalement pigmentée de la deuxième feuille (fig. 30, stade 1), sont en tout point semblables à ceux des régions correspondantes des plantules témoins. Par contre, dès la région vert pâle, on peut déceler les premières altérations plastidiales (fig. 30, stade 2).

Celles-ci n'affectent, à ce niveau, que les plastes à grana dont nous suivrons d'abord l'évolution dans les régions de pigmentations différentes. Ils sont alors plus ou moins déformés et on y décèle en outre des ruptures de lamelles intergrana (Pl. XVIII et Pl. XIX). Les deux feuillets du saccule aplati constituant la lamelle intergrana, normalement accolés l'un contre l'autre, sont souvent distincts (Pl. XX).

Au stade suivant (fig. 30, stade 3) on observe une diminution du nombre des saccules de grana et des lamelles intergrana. Ces dernières, plus minces, se groupent en faisceaux laissant entre eux des espaces vides (Pl. XXI, fig. 1). Ces altérations s'accentuent dans la région jaune-vert (fig. 30, stade 4) où l'on n'observe que quelques lamelles et des grana formés de deux à cinq saccules (Pl. XXI, fig. 2). Au stade 5 on ne trouve plus, à l'intérieur des plastes, que de rares vestiges de lamelles ou de tubules, groupés en faisceaux, divergeant souvent d'un amas de vésicules. Enfin, dans la zone blanche (stade 6), les plastes très déformés, amiboïdes, sou-

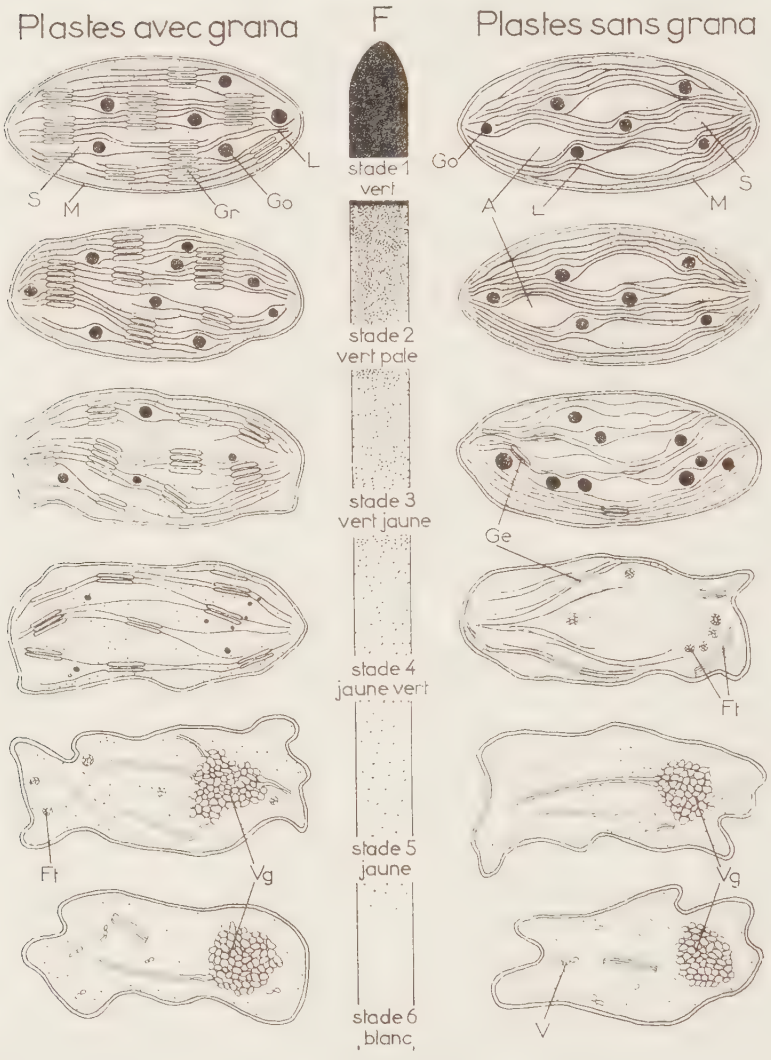


Fig. 30. — Schéma des modifications de l'ultrastructure des chloroplastes des feuilles de Maïs induites par l'AAMT.

F : schéma de la deuxième feuille d'une plantule traitée ; l'intensité de la pigmentation diminuant depuis la pointe verte (stade 1) jusqu'à la région non pigmentée (stade 6), est représentée par une teinte plus ou moins foncée. A gauche de la feuille, modifications des plastes à grana ; à droite, modifications des plastes sans grana.

A, amidon ; Ft, faisceau de tubules ; Ge, granum embryonnaire ; Go, globules osmiophiles ; Gr, granum ; L, lamelles de stroma ou lamelles intergrana ; M, membrane double limitant le plaste ; V, vésicules ; Vg, vésicules groupées.

vent même difficiles à identifier, ne contiennent plus qu'un amas de vésicules (Pl. XXIII, fig. 2). Le reste du plaste apparaît « vide » (Pl. XXIII, fig. 1).

Les plastes sans grana subissent eux aussi des altérations, mais elles ne sont décelables qu'à partir des régions vert-jaune (fig. 30, stade 3). On note alors une diminution du nombre des lamelles de stroma qui se dispersent en faisceaux irréguliers. Sur leur trajet on observe des structures rappelant les ébauches de grana des proplastes en cours de différenciation. Dans la zone jaune-vert (fig. 30, stade 4) on ne trouve plus, dans ces plastes, que quelques lamelles montrant encore des ébauches de grana, tandis que, dans la région jaune, ils sont très déformés et ne contiennent plus que quelques faisceaux de tubules (Pl. XXII). Enfin, dans les régions fortement dépigmentées, il n'est plus possible de distinguer les deux types de plastes qui montrent alors des figures d'altération identiques. Si la taille du plaste et sa membrane limitante semblent, malgré des déformations possibles, peu modifiées par l'AAMT, cette substance, par contre, altère plus ou moins fortement les autres éléments internes du plaste.

Les globules osmiophiles lipidiques sont souvent très abondants et de grosse taille jusque dans la région vert pâle (Pl. XVIII, Pl. XIX et Pl. XX) (plaste à grana), et vert-jaune (plaste sans grana), puis leur nombre et leur grosseur diminuent ensuite dans les autres régions. Ils ont pratiquement disparu des régions les plus altérées.

Les vésicules amylifères diminuent, elles aussi, de taille dès que les lamelles des plastes à grana sont altérées (stade 3), et l'on n'en observe plus dès la région jaune-vert (stade 4).

Enfin le stroma, homogène dans les chloroplastes normalement pigmentés, devient hétérogène dès que la pigmentation est altérée. Il forme, dans le chloroplaste de la région vert pâle, des travées granuleuses qui séparent des zones ne diffractant pas les électrons. Ces zones « claires » vont en augmentant au fur et à mesure que la pigmentation foliaire est altérée, de telle sorte que, dans la région blanche, les plastes apparaissent entièrement perméables aux électrons sauf à la périphérie et au voisinage de l'amas de vésicules.

L'AAMT provoque également des modifications des autres éléments cytoplasmiques. Les mitochondries ne possèdent plus, dans les régions non pigmentées, que de très petites crêtes (Pl. XXIV). Dans ces mêmes régions on ne peut discerner de formations de Golgi. Par contre, le réticulum endoplasmique ne semble pas atteint. On constate enfin une accumulation de substances osmiophiles dans le cytoplasme des cellules des régions blanches.

Au cours de ces observations, nous avons donc pu constater que l'infrastructure des divers territoires intracellulaires est pro-

fondément modifiée par l'AAMT. Les mitochondries, l'appareil de Golgi, le cytoplasme lui-même, sont touchés, mais ce sont les plastes qui présentent les modifications les plus importantes. Ils sont d'autant plus déformés que leur structure interne est plus altérée. Si l'AAMT ne semble pas modifier profondément leur taille et la nature de la membrane limitante, elle empêche par contre l'édification du système lamellaire interne. La différenciation des lamelles intergrana et celle des grana sont inhibées simultanément, ainsi que l'élaboration de l'amidon et des globules osmiophiles. La structure et la composition du stroma sont profondément modifiées.

III. — CONCLUSIONS

Si l'on compare le mode d'action de la DSM à celui de l'AAMT, on constate que ces deux substances sont susceptibles de déterminer, à des degrés divers, des modifications profondes des éléments structurés de la cellule.

Elles ralentissent fortement la formation des crêtes dans les mitochondries et empêchent la formation des chondriocontes. L'appareil de Golgi semble disparaître sous leur action, tandis que ces deux substances ne paraissent pas affecter le réticulum endoplasmique. Elles provoquent l'accumulation, dans le cytoplasme, de substances osmioréductrices sous forme de granulations semblables aux grains de Palade.

D'autre part, si les deux substances étudiées sont sans action sur la structure des plastes différenciés au moment où elles agissent, elles provoquent, par contre, de profonds bouleversements de la structure des plastes qui se différencient en leur présence. Les altérations sont d'autant plus importantes que la substance a agi sur des plastes plus jeunes, en début de différenciation. La taille du plaste et la structure de sa membrane limitante sont peu touchées, alors que toute son organisation interne est plus ou moins inhibée. C'est ainsi que l'accumulation de substances osmioréductrices dans le stroma est complètement inhibée par la DSM et l'AAMT dans les régions les plus dépigmentées alors que nous avons signalé ci-dessus que, parallèlement, de telles substances sont présentes dans le cytoplasme de ces mêmes cellules. Par ailleurs, ces deux composés provoquent une altération irréversible des structures lamellaires internes du plaste, mais, alors que l'AAMT détermine une inhibition progressive et simultanée de la formation des lamelles intergrana et des grana, la DSM bloque l'édification des lamelles intergrana, réduites à des chaînettes de vésicules, tandis que les grana ont une structure normale. Les deux systèmes lamellaires du plaste, lamelles des grana et lamelles intergrana, semblent donc posséder une sensibilité différente vis-à-vis de la DSM.

De plus, il nous faut signaler que, étant donnée, d'une part, la structure fine des plastes au moment où la substance agit, et, d'autre part, celle que l'on observe lorsque la feuille traitée s'est différenciée, on doit admettre que l'action des inhibiteurs n'est pas immédiate et que l'édification de la lamellisation interne peut se poursuivre, quelques temps encore, en présence de cet inhibiteur.

Parallèlement à la disparition du système lamellaire du stroma, on observe celle des enclaves amylifères, dans les plastes sans grana. Cette disparition intervient plus rapidement sous l'action de la DSM que sous celle de l'AAMT.

Enfin la DSM inhibe progressivement la formation des globules osmioréducteurs du plaste, tandis que l'AAMT semble d'abord favoriser leur constitution et provoquer ensuite leur altération.

En résumé, la DSM et l'AAMT agissent de manière sensiblement identique sur l'ensemble des structures intracellulaires, mais suivant des processus différents sur les structures internes des plastes. Ces observations confirment nos précédentes remarques concernant l'action de ces deux substances sur la teneur en pigments des feuilles altérées et sur les modifications de leurs chloroplastes observées en microscopie photonique.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

Parvenu au terme de cet exposé, il convient maintenant de résumer les résultats que nous avons obtenus en les comparant avec ceux de nos devanciers. Cette confrontation nous amènera à isoler les faits originaux qu'apporte notre travail, à analyser la contribution qu'ils fournissent, dans le cadre de l'effort de synthèse que nous avons entrepris et surtout à évoquer les problèmes qu'ils suscitent.

I. — CROISSANCE ET MORPHOGENESE

Nos expériences ont permis de montrer, d'une manière générale, que la quasi-totalité des substances que nous avons expérimentées sont des inhibiteurs du développement des végétaux supérieurs et inférieurs. Seule la pénicilline ne provoque aucun trouble ni de la croissance, ni de la morphogenèse, même aux concentrations les plus élevées. Bien qu'il n'exerce aucun effet stimulant sur les plantules, cet antibiotique joue le rôle d'une substance excito-formatrice vis-à-vis du rhizome de Topinambour, ce qui confirme d'ailleurs des résultats antérieurs de Camus et Lance [**17**], L'on peut même, en l'utilisant, obtenir une souche à croissance indéfinie, ce qui complète, en les étendant, les observations de nos devanciers dans ce domaine.

Quant au groupe des inhibiteurs qui rassemble la DSM, l'auréomycine, la terramycine, l'AAMT et l'AT, les différents composés qu'il renferme possèdent tous une action toxique à l'égard des végétaux sur lesquels ils agissent. Les rares stimulations que l'on observe quelquefois aux concentrations les plus basses que nous ayons expérimentées, sont toujours de trop faible amplitude pour être réellement significatives.

Nos recherches, par ailleurs, ont permis de montrer que le seuil d'action, c'est-à-dire celui pour lequel commencent à se manifester les troubles de la croissance et de la morphogenèse, varie selon la substance étudiée, d'une part, et, d'autre part, pour une même substance, selon le type de matériel soumis à son action. Pour la DSM, par exemple, les tissus de Carotte cultivés *in vitro* commencent à réagir à une concentration de 10^{-6}, alors qu'il faut atteindre des concentrations de 10^{-3} pour obtenir un résultat identique avec les Algues unicellulaires. Les autres composés ont, en général,

des seuils d'action plus bas que celui de la DSM, leur influence sur la morphogenèse se manifestant en effet pour des concentrations cinq à dix fois plus faibles que celle de la DSM. Les troubles qu'ils provoquent sont plus marqués que ceux induits par l'antibiotique, affectant plus particulièrement le système radiculaire. D'une manière générale, d'ailleurs, les modifications morphologiques qui accompagnent l'inhibition de la croissance atteignent toujours le système radiculaire avant le système caulinaire.

Nos observations confirment donc, en les étendant, les observations généralement fragmentaires de nos devanciers. Le seul point de désaccord concerne les travaux de Netien et coll. [**141**, **143**] et ceux de Sotty [**197**] à propos de l'action de la DSM sur les cultures de tissus. Contrairement à ces auteurs, nous n'avons jamais observé, pour des concentrations inférieures au seuil d'action qui se situe à 10^{-6} pour le tissu de Carotte et à 10^{-4} pour celui de Topinambour, de stimulation sur ces matériels cultivés *in vitro*. Notre affirmation s'appuie sur des observations répétées et complétées par une analyse statistique approfondie, conditions expérimentales qui s'opposent à celles des auteurs précités.

II. — PIGMENTATION ET TENEUR EN PIGMENTS

Dans ce domaine encore, la pénicilline représente un cas particulier. Contrairement aux autres substances expérimentées, elle ne détermine qu'une très faible diminution de la pigmentation et seulement lorsqu'elle agit à forte concentration pendant des périodes prolongées sur les tissus de Topinambour. Le phénomène, décelable sur la souche, obtenu 6 ou 8 mois après son isolement, ne se produit en aucun cas sur des plantules, quelle que soit la dose d'antibiotique étudiée.

Quant à la totalité des autres facteurs, dont l'action antichlorophyllienne n'avait fait l'objet que de travaux très fragmentaires, se bornant le plus souvent à signaler l'existence de chloroses après l'application des composés concernés, l'étude exhaustive à laquelle nous nous sommes livré nous a permis de montrer que ces agents interviennent dans la pigmentation du matériel sur lequel ils agissent selon des modalités très particulières. C'est ainsi que ne deviennent chlorotiques que les parties du végétal se développant pendant l'application de la substance. Celles formées avant ou après cette application sont normalement pigmentées, et les altérations de pigmentation obtenues sont définitives.

Nous avons pu montrer, d'autre part, que, d'une manière analogue à ce qui se passe pour la croissance et la morphogenèse, le seuil d'action de ces substances sur la pigmentation des matériels traités varie selon la substance et selon le matériel étudié. C'est

ainsi que les premiers symptômes de chlorose provoquée par la DSM chez les végétaux supérieurs sont décelables à partir d'une dose de DSM de 5.10^{-4} alors que dans le cas de l'auréomycine, de la terramycine, de l'AAMT ou de l'AT, une concentration cinq fois plus faible suffit pour obtenir les mêmes altérations.

Autre élément original de notre travail, l'analyse détaillée des modifications pigmentaires provoquées par ces différents facteurs, nous a permis de les diviser en deux catégories. Alors que la DSM et les tétracyclines constituent l'une d'entre elles, l'AAMT et l'AT se rangent dans l'autre.

Dans le premier groupe, représenté par la DSM, on assiste à une inhibition progressive de tous les pigments foliaires, la chlorophylle *a* étant la plus fortement touchée, alors que les caroténoïdes paraissent plus résistants.

Quant aux représentants de l'autre groupe, ils induisent, par contre, une diminution simultanée des deux chlorophylles, tout en provoquant l'apparition de caroténoïdes nouveaux dans les feuilles, remplaçant progressivement le β-carotène. Ces pigments nouveaux seraient au nombre de quatre ; le plus abondant d'entre eux, se formant sous l'action de l'AAMT, serait probablement du lycopène ou un pigment extrêmement voisin.

Ces résultats, obtenus à partir de l'Orge et du Maïs, matériels dans lesquels il est possible d'observer des cellules à tous les stades de différenciation et de pigmentation sur une même feuille ou sur des feuilles homologues, ont été établis dans des conditions expérimentales qui permettent de noter les réactions progressives à l'action des substances étudiées. Aussi nos résultats, non seulement confirment-ils les quelques observations fragmentaires effectuées sur la DSM [**99**, **180**, **181**, **182**], mais les étendent considérablement, car même pour cette substance, ils apportent des précisions sur l'évolution du phénomène, alors que les autres observations ne portaient que sur les termes extrêmes de la transformation. De plus, ils mettent en évidence un mode d'action sur la synthèse des pigments entièrement nouveau et différent de celui qu'exerce la DSM.

Il est fort probable d'ailleurs que les chloroses provoquées sur les végétaux par des facteurs divers, tels que température, radiations ultraviolettes, radiations diverses ou carences, suivent, pour s'établir, des processus différents. La seule indication fournie dans ce domaine, antérieurement à nos résultats, était celle de Lefort [**111**] qui a observé des modifications pigmentaires variées dans divers types de mutants de Tomate, obtenus sous l'effet de rayonnements ionisants.

A la suite de nos observations, il n'est donc plus possible de

penser que toutes les substances antichlorophylliennes agissent selon un schéma identique.

Quel que soit le composé expérimenté, les chlorophylles ne peuvent se former, mais l'inhibition pigmentaire s'établit certainement de manière différente selon que l'on s'adresse à l'un ou à l'autre d'entre eux. L'AAMT et l'AT, qui bloquent rapidement et simultanément la formation des deux chlorophylles, doivent agir assez précocement sur la chaîne de biosynthèse de ces pigments. Cette hypothèse est d'ailleurs en accord avec certains résultats concernant l'AT publiés récemment [**18**, **45**, **46**, **47**]. Quant à la DSM, qui agit progressivement sur la formation des chlorophylles *a* et *b*, et permet encore une synthèse partielle de la seconde, alors que la première ne peut plus être élaborée, il est plus difficile de localiser le lieu de son action. Des travaux récents tendent en effet à montrer que la chlorophylle *b* proviendrait de la transformation de la chlorophylle *a* [**33**, **193**].

S'il est difficile, dans l'état actuel de nos connaissances, de préciser le point où les antichlorophylliens agissent sur la synthèse des chlorophylles, nos résultats, par contre, permettent d'apporter quelques précisions quant à l'action de ces substances sur la formation des caroténoïdes.

Nous référant aux schémas de synthèse proposés par Porter et Lincoln [**156**] et par Granick [**66**], nous pouvons penser que la DSM interviendrait dès les premières étapes de leur formation, car nous n'avons pas pu mettre en évidence, dans le matériel traité, de précurseur immédiat du β-carotène. Par contre, il apparaît clairement, dans le cas de l'AT et plus clairement encore dans celui de l'AAMT, que ces deux inhibiteurs agissent au niveau des toutes dernières étapes de la chaîne, puisque nous observons une accumulation de composés très voisins du lycopène, que l'on peut considérer comme un tel précurseur.

L'ensemble des faits que nous avons rapportés concernant les chloroses provoquées par diverses substances antichlorophylliennes, montre donc qu'elles s'établissent en suivant des voies différentes. En résumant ci-dessous nos observations concernant les altérations que ces mêmes substances engendrent dans les chloroplastes, nous tenterons de les relier aux modifications du métabolisme pigmentaire discutées ci-dessus.

III. — MORPHOLOGIE DES CHLOROPLASTES

Nos recherches cytologiques nous ont permis de recueillir un ensemble important d'observations, entièrement originales, que les quelques travaux concernant ce sujet, parus postérieurement aux nôtres, ont totalement confirmées.

D'une manière générale, nous avons constaté que les substances antichlorophylliennes expérimentées, si elles ne semblent pas empêcher la multiplication des plastes, engendrent, parallèlement à des modifications pigmentaires, des altérations de la morphologie de ces organites.

Comme précédemment, la pénicilline doit être mise à part, car elle ne produit que de très légères altérations des chloroplastes, à forte concentration, après un temps d'action très long, et uniquement sur les tissus de rhizome de Topinambour cultivés *in vitro*.

Tous les autres agents utilisés, la DSM, l'auréomycine, la terramycine, l'AAMT et l'AT, provoquent, chez les végétaux, de très importantes altérations irréversibles des chloroplastes qui n'atteignent, ni les chloroplastes différenciés des végétaux supérieurs, ni ceux qui ne se divisent pas chez les végétaux inférieurs.

Par contre, lorsqu'ils agissent au moment où se différencient les plastes des végétaux supérieurs, ils inhibent partiellement ce processus, sans toutefois bloquer complètement le grandissement du plaste. Il en résulte des organites altérés, de taille un peu inférieure à la normale, peu ou pas colorables par leurs réactifs habituels (hématoxyline de Regaud ou fuchsine d'Altmann), apparaissant vides ou vésiculisés au microscope. Ces observations nous permettent de conclure à une altération importante de leur structure interne. Si nos observations ont été confirmées par celles de Rossner [**171**], puis très récemment par Döbel [**30**], nous ne pouvons partager les vues de Von Euler et coll. [**42**] qui assimilent ces plastes altérés à des leucoplastes : ils n'en ont ni les caractères morphologiques, ni les réactions cytologiques.

Nous devons ajouter, de plus, que, si l'agent concerné n'est pas appliqué au-delà d'une certaine durée, variable selon le matériel utilisé, son action est limitée aux plastes en cours de différenciation au moment du traitement, ceux qui accomplissent ensuite leur développement ayant un aspect tout à fait normal.

Chez les végétaux inférieurs, les chloroplastes, toujours différenciés, qui se divisent en présence de la substance étudiée, diminuent de taille à chaque division jusqu'à atteindre une dimension minimum, souvent voisine de celle des chondriosomes, et sont alors incapables de grandir. Les organites modifiés sont plus ou moins difficilement colorables, selon les végétaux, par les réactifs plastidiaux. Ici encore, si la durée d'action de la substance ne dépasse pas un certain seuil, variable selon le matériel étudié, les plastes qui se développent après le traitement reprennent un aspect normal. Nos observations ont trouvé confirmation dans les quelques travaux concernant ce sujet, presque tous très récents, et qui ont trait uniquement aux Euglènes [**28**, **112**, **184**, **228**].

Nos observations cytologiques indiquent, d'autre part, que le chondriome, chez tous les végétaux, semble beaucoup moins sensible que les chloroplastes à l'action des antichlorophylliens.

En résumé, nous avons donc, le premier, démontré que les divers composés expérimentés inhibent la synthèse de la substance plastidiale dans l'ensemble des matériels étudiés, matériels occupant des positions bien différentes dans la classification végétale. Mais, alors que chez les végétaux inférieurs, le système qui provoque le grandissement du plaste paraît très touché, il ne semble que partiellement atteint chez les végétaux supérieurs. De plus, les diverses substances n'empêchent pas la multiplication des plastes, car même dans les parties les plus dépigmentées des végétaux traités, ou dans les souches blanches, on trouve toujours des vestiges de ces organites.

Enfin, si l'on étudie plus particulièrement les altérations des chloroplastes dans les zones de transition pigmentaire apparues, chez l'Orge et le Maïs, on constate que les divers composés antichlorophylliens n'agissent pas de manière identique. On doit distinguer parmi eux deux catégories. L'une d'elles, groupant la DSM, l'auréomycine et la terramycine, provoque une diminution progressive et homogène de la chromaticité des chloroplastes, tandis que cette diminution se produit de manière hétérogène sous l'action de l'AAMT et de l'AT ; des plages et des structures chromophiles peuvent, dans ce dernier cas, coexister dans le plaste altéré avec des zones non colorables. Ces différences importantes que nous avons mises en évidence traduisent, à coup sûr, des modes d'action variant selon le composé étudié.

Il nous faut alors remarquer que les deux groupes de substances que nous venons de mettre en évidence, parmi les composés antichlorophylliens, grâce à l'observation des altérations plastidiales qu'ils provoquent, correspondent à ceux que nous avons définis ci-dessus, en particulier lors de l'analyse des modifications du métabolisme pigmentaire. Nous avons donc ainsi démontré la relation existant entre les troubles de ce métabolisme et ceux affectant les structures cytologiques.

*
* *

Avant de résumer les observations faites au microscope électronique sur les modifications engendrées par une substance appartenant à chacun des groupes indiqués ci-dessus, la DSM et l'AAMT, considérons maintenant les résultats concernant les ultrastructures normales des chloroplastes de Maïs et les modalités de leur différenciation. Une connaissance précise de ces modalités est, en effet, nécessaire pour l'interprétation des figures d'altérations observées.

IV. — STRUCTURE FINE ET DIFFÉRENCIATION DES CHLOROPLASTES DE MAÏS

Nous avons tout d'abord vérifié, ainsi que Hodge et coll. l'indiquaient, que l'on trouve, chez le Maïs, deux types de chloroplastes ; ceux du mésophylle possèdent un système lamellaire formé de grana reliés par des lamelles intergrana, appelées encore lamelles de stroma, tandis que les chloroplastes du parenchyme périvasculaire ne comportent que de longues lamelles que l'on peut assimiler à des lamelles de stroma [**90**].

***

Par contre, les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude du mode de différenciation de ces chloroplastes, ne nous permettent pas de partager la plupart des vues de ces auteurs à ce propos [**89**].

C'est ainsi que nos propres observations ont montré que les proplastes, peu distincts des mitochondries dans les cellules les plus méristématiques, édifient leur système lamellaire interne aux dépens de vésicules formées par invagination du feuillet interne de la double membrane les limitant. Ces vésicules, apparemment toutes semblables, donnent naissance à deux types de saccules aplatis constituant : les uns, les lamelles de stroma, les autres, les grana. Il n'existe pas d'ordre strict dans l'apparition de ces deux types de structure. Nous avons montré, de plus, que la disposition des grana se régularise lorsque le jeune chloroplaste se différencie : ils forment alors de véritables piles, que Strugger a décrit depuis longtemps chez divers végétaux [**205**].

Le long des faisceaux vasculaires les plastes se différencient plus tardivement, et ne possèdent, essentiellement, que de longues lamelles de stroma. On n'y observe, par places, que de petits grana, qui semblent être ensuite inhibés, et ne se développent pas.

Enfin, nous avons observé que, dans une plantule de Maïs, on trouve toujours, à un moment donné, le long des feuilles qui n'ont pas encore achevé leur croissance, tous les intermédiaires possibles entre les proplastes indifférenciés et les chloroplastes ayant achevé leur développement.

Ces diverses observations sont donc en désaccord profond avec les affirmations de Hodge et coll. [**89**], qui postulent que la différenciation des proplastes en chloroplastes est identique à la transformation intervenant lorsque des plastes de feuilles étiolées verdissent à la lumière. Dans le cas d'une telle transformation, on observe effectivement, d'une manière systématique, un « prolamellar body » analogue au « primärgranum » de Strugger, auquel Hodge assigne, avec juste raison dans de telles conditions, le rôle d'initia-

teur du système lamellaire interne du chloroplaste. Nous avons donc démontré que la situation réelle était profondément différente du schéma proposé par ces auteurs.

Certes, au cours de l'étude de la différenciation normale des proplastes en chloroplastes, nous avons parfois pu déceler un granum primaire dans les proplastes marquant déjà un début de différenciation, mais nous avons pu montrer qu'il s'agissait d'une structure éphémère. Celle-ci n'est décelable, en effet, que pendant quelques heures, après le début de l'éclairement journalier, et disparaît ensuite très rapidement en se transformant en lamelles.

Il semble donc que le « granum primaire », ou « prolamellar-body », n'existe, chez le Maïs se développant normalement à la lumière selon le rythme journalier, que dans les jeunes proplastes différenciés au cours de la nuit et n'ayant pas reçu une quantité suffisante d'énergie lumineuse, puisqu'au début du jour, dès que l'éclairement est suffisant, les vésicules s'orientent et forment les lamelles aux dépens du granum primaire qui disparaît alors rapidement. Lorsque le proplaste possède un début de structuration interne, il semble qu'il puisse accumuler, à la lumière, suffisamment d'énergie pour pouvoir continuer, même pendant les périodes obscures suivantes, l'édification des lamelles.

Ces conclusions obtenues à la suite d'une étude expérimentale du rôle de la lumière, chez le Maïs, confirment, en les étendant, les observations de plusieurs auteurs [**57, 58, 110, 137, 224**], qui tendaient à montrer que la formation de « granum primaire » résultait d'un éclairage insuffisant du végétal. Les divergences existant entre les conclusions formulées par les divers auteurs qui ont abordé le problème, sont dues, soit à des conditions expérimentales mal définies, soit au fait que la structure étudiée est particulièrement fugace chez certains végétaux.

***

Jusqu'à présent, nous n'avons envisagé que l'initiation du système lamellaire interne du jeune plaste. Il nous faut maintenant aborder l'étude de la diversification de celui-ci au cours de la différenciation du chloroplaste.

Nous avons retrouvé, dans notre matériel, le mode d'édification des lamelles déjà décrit par divers auteurs sur d'autres végétaux : formation par invagination de la membrane limitant le proplaste de vésicules paraissant toutes semblables, alignement et coalescence de ces dernières pour former, soit des disques granaires, soit des lamelles de stroma.

Outre ces vérifications, nous avons précisé le mode de différenciation des types de chloroplastes que l'on rencontre dans les

feuilles de Maïs, et nous avons montré que, dans les plastes à grana, les lamelles de stroma et les grana se forment simultanément, tandis que, dans les plastes du parenchyme périvasculaire, il ne se forme que quelques ébauches de grana qui semblent régresser par la suite.

Notons toutefois, bien que le microscope électronique ne mette pas en évidence de différence de structure fine entre ces deux types de lamelles, que cette diversification à l'intérieur des chloroplastes correspond certainement à l'établissement de fonctions différentes. C'est ainsi que nous avons constaté que l'amidon, qui apparaît dans la substance fondamentale des chloroplastes uniquement au voisinage des lamelles de stroma, est particulièrement abondant dans les plastes sans grana qui ne contiennent que ce dernier type de lamelles. La relation est suffisamment nette pour mériter d'être signalée ici, sans qu'il puisse être question, cependant, de tirer une conclusion précise au niveau moléculaire.

*
* *

Enfin, au moment où nous avons effectué nos recherches, planait encore une certaine ambiguité quant aux rapports existant entre les lamelles de stroma et celles constituant les grana.

Nos observations concernant la structure des plastes à grana, et surtout l'étude détaillée de leur mode de différenciation, ne nous permettent pas de partager, ici encore, les vues de Hodge et coll. [**90**] sur ce point. Alors que ces auteurs pensent que les grana se forment par bifurcation des lamelles intergrana, nous avons montré qu'en fait, chez le Maïs, les longs saccules constituant ces dernières, s'insèrent entre ceux plus courts, dont l'empilement constitue les grana. Cette disposition est identique à celle que décrivent Wehrmeyer et Perner dans le cas de *Spinacia* [**221**]. De telles divergences de vues peuvent d'ailleurs être partiellement expliquées quand on sait que le chloroplaste, même différencié, est le siège de constants remaniements. C'est ainsi que la disposition des grana, dont le nombre de saccules augmente avec l'âge du plaste, se régularise et que des ruptures de lamelles intergrana peuvent alors se produire. De plus, on sait que la sénescence entraîne des troubles importants de cette structure [**210**].

V. ACTION DE LA DIHYDROSTREPTOMYCINE (DSM) ET DE L'ACIDE 3-(α-IMINOETHYL)-5-METHYLTETRONIQUE (AAMT) SUR LA STRUCTURE FINE DES CHLOROPLASTES DE MAIS

La microscopie électronique nous a d'abord permis de vérifier diverses conclusions auxquelles nous avait mené la cytologie clas-

sique, et notamment, la « résistance » des plastes différenciés à la DSM et à l'AAMT, ou encore certaines considérations sur le volume de ces organites.

Mais, en outre, elle nous a permis de préciser le comportement des divers territoires plastidiaux, dont il semble qu'ils réagissent différemment à l'action de ces deux substances. C'est ainsi, en particulier, que le processus de désorganisation interne des plastes en cours de différenciation lors de l'action de l'antichlorophyllien, n'est pas identique selon qu'il s'agit de la DSM ou de l'AAMT.

Rappelons, en effet, que la DSM bloque l'édification des lamelles intergrana qui sont réduites à des chaînettes de vésicules, alors que les grana montrent encore une structure normale. Ces figures d'altération, que l'on observe dans les régions vert pâle et vert-jaune des feuilles traitées, proviennent de l'évolution de jeunes chloroplastes qui possédaient déjà un système lamellaire ébauché lors de l'intervention de l'antibiotique. Celui-ci a bloqué la formation des lamelles intergrana sans inhiber simultanément l'édification de nouveaux saccules de grana. Cette remarque est également valable pour les autres régions, puisque, même dans les parties jaunes de la feuille, on observe encore dans les plastes, un ou deux grana, très aberrants, de grande taille, tandis qu'il n'existe aucune trace de lamelles intergrana. Seuls les proplastes ne possédant aucune structure lamellaire quand la substance agit, ne montrent pas, par la suite, de lamelles internes dans les régions totalement dépigmentées. Il semble donc que le système concourant à la formation des saccules de grana soit moins sensible à l'action de la DSM que celui édifiant les lamelles intergrana.

Ces faits renforcent l'hypothèse formulée ci-dessus, selon laquelle les vésicules émises par le feuillet interne de la membrane du plaste subissent, en se transformant en saccules, des modifications différentes suivant qu'elles donnent des lamelles intergrana ou des grana. On peut également penser que, lorsqu'un système est en fonctionnement, il peut encore fonctionner quelques temps, même en présence de l'inhibiteur. Une telle hypothèse permettrait d'expliquer en particulier l'augmentation du nombre des saccules de grana observée dans les plastes les moins altérés des plantules traitées par la DSM, surtout si ce système est peu sensible à l'action de la substance, ou si la substance n'intervient que de manière très indirecte.

L'AAMT, à l'inverse de la DSM, inhibe simultanément la formation des lamelles intergrana et celle des grana. Ces deux types de structures présentent donc une égale sensibilité à l'action de l'AAMT. Ici encore, étant donnée, d'une part la structure fine des plastes en cours de différenciation lorsque la substance agit, et d'autre part les figures d'altérations observées, on peut penser,

ainsi que nous l'indiquions ci-dessus, que l'édification du système lamellaire interne du plaste se poursuit encore quelques temps après l'application de la substance, ce qui n'est, en fait, guère surprenant.

Si l'on passe maintenant, aux autres éléments figurés du plaste, il convient de rappeler que la DSM inhibe plus rapidement que l'AAMT la formation des enclaves amylifères. Enfin, les globules osmiophiles internes disparaissent progressivement sous l'action de la première substance, tandis que la seconde provoque, d'abord leur augmentation dans les régions vert pâle et vert-jaune, puis leur régression dans les régions suivantes. Dans ce dernier cas, il est permis de se demander si l'augmentation de ces formations ne correspondrait pas à une accumulation des caroténoïdes, dont nous avons montré, d'autre part, que le métabolisme était perturbé.

Il faut noter que la presque totalité des substances osmiophiles présentes normalement dans le stroma, a disparu des plastes des régions les plus dépigmentées, alors que l'on observe une accumulation de ces substances dans le cytoplasme des cellules de ces mêmes régions. Ces observations sont à rapprocher de celles effectuées, dans un autre domaine, par de Deken-Grenson [27] qui signale que le taux de protéines et d'acides nucléiques diminue considérablement dans les plastes altérés par la DSM, alors que la quantité d'acides aminés libres augmente dans les cellules. Il est donc fort probable que la DSM et l'AAMT empêchent l'incorporation de ces substances osmiophiles dans le stroma du plaste.

VI. — CONCLUSIONS

Si le but que nous nous étions proposé en entreprenant ce travail avait été complètement atteint, ce chapitre de considérations générales aurait normalement dû se terminer par un dernier paragraphe dans lequel nous aurions envisagé les relations existant entre structure plastidiale et synthèse des pigments.

Or en dépit des nombreux résultats que nous avons obtenus, soit qu'ils confirment ceux de nos devanciers, comme par exemple dans le cas de la relation lamelles-pigments, ou qu'ils présentent un caractère plus original, et c'est le cas de l'étude comparée des modifications plastidiales et pigmentaires provoquées par la DSM et l'AAMT, nous devons reconnaître que notre tâche est loin d'être achevée. En effet, l'état actuel des informations que nous avons apportées ne nous autorise pas à nous aventurer, même en ne formulant que des hypothèses, dans un domaine d'une extrême complexité.

Certes, nous pourrions rappeler dans ce dernier paragraphe que la DSM, qui provoque préférentiellement la disparition des lamelles intergrana, induit en même temps une diminution de l'ensemble des

pigments normalement présents dans les feuilles. Ces résultats pourraient être rapprochés, *a contrario*, du fait que l'AAMT, qui perturbe simultanément la totalité des structures lamellaires internes du plaste, semble agir de manière différente sur la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes. Il n'en reste pas moins, à nos yeux, que les conclusions plus générales que l'on pourrait tirer du rapprochement de ces diverses observations, n'auraient guère de portée tant qu'elles ne seront pas précisées par d'autres résultats.

L'obtention de ceux-ci, toutefois, pose des problèmes et de schémas expérimentaux, et de techniques nouvelles, qu'il ne nous était pas possible d'envisager dans le cadre de ce travail.

C'est à l'examen de ces problèmes que nous consacrerons nos recherches futures et nous essaierons de les aborder par la conjonction de multiples techniques, même si les premiers essais que nous venons de réaliser n'ont pas été aussi fructueux que nous l'aurions souhaité au départ.

BIBLIOGRAPHIE

1. Aaronson (S.) et Bensky (B.), 1962. — O-Methylthreonine, a new bleaching agent for *Euglena gracilis*. *J. gen. Microbiol.*, **27**, p. 75-98.
2. Alamercery (S.), Hamner (C.L.) et Latus (M.), 1951. — Chlorophyll inhibition and growth regulation by several tetronic acide derivatives. *Nature*, **168**, p. 85.
3. Albertini (A.), Hohl (H.R.), Manigault (P.), Stoll (C.H.) et Vogel (A.), 1961. — Similitudes et différences entre les tumeurs expérimentales et le Crown-gall. *Phytopath. Z.*, **41**, p. 55-58.
4. Algera (L.), Beijer (J.J.), Van Iteron (W.), Karstens (W. K.H.) et Thung (T.H.), 1947. — Some data on the structure of the chloroplast, obtained by electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1**, p. 517-526.
5. Anand (N.), Davis (B.D.) et Armitage (A.K.), 1960. — Uptake of Streptomycin by *Escherichia coli*. *Nature*, **185**, p. 23-24.
6. Ashton (F.M.), Gifford (E.M.) et Bisalputra (T.), 1963. — Structural changes in *Phaseolus vulgaris* induced by atrazine. *Bot. Gaz.*, **124**, p. 329-343.
7. Bauer (L.), 1952. — Trennung der Karotinoide und Chlorophylle mit Hilfe der Papierchromatographie. *Naturwiss.*, **4**, p. 88.
8. Beauverie (J.), 1938. — La structure granulaire des grains de chlorophylle. *Rev. Cyt. Cytophys. Vég.*, **3**, p. 80-109.
9. Bernhard (W.), 1955. — Appareil de déshydratation continue. *Exptl. Cell. Res.*, **8**, p. 248-249.
10. Bertossi (F.), 1953. — Su di una « modificazione somatica » permanente provocata da diidrostreptomicina in un ceppo di tessuto di *Helianthus tuberosus*. *Atti dell' Istituto Botanico e Laboratorio Crittogamico di Pavia*, **10**, p. 225-229.
11. Bogorad (L.), Pires (G.), Swift (H.) et McIlarth (W.J.), 1959. — The structure of chloroplasts in leaf tissue of iron deficient *Xanthium*. *Brookhaven Symposia in Biology*, **11**, p. 132-137.
12. Bohm (J.A.), 1856. — Beiträge zur Näheren Kenntniss des Chlorophylls. *Sitzungsb. Wiener Akad. Wiss.*, **22**, p. 479-512.
13. Brian (P.W.), 1957. — Effects of antibiotics on plants. *Plant Physiol.*, **8**, p. 413-426.
14. Bustinza (F.L.) et Caballero (L.A.), 1946. — Contribución al estudio de la influencia de los antibióticos en la germinación de las semillas. *Ann. Jard. Bot.*, Madrid, **7**, p. 177-196.
15. Buvat (R.), 1944-1945. — Recherches sur la dédifférenciation des cellules végétales. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 11e série, **5** et **6**.

16. Buvat (R.), 1958. — Recherches sur les infrastructures du cytoplasme dans les cellules du méristème apical des ébauches foliaires et des feuilles développées d'*Elodea canadensis*. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 11e série, **19**, p. 121-161.

17. Camus (G.) et Lance (C.), 1955. — Action de la pénicilline G sur le développement de tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Biol.*, **31**, p. 263-279.

18. Carter (M.-C.) et Naylor (A.W.), 1961. — The effect of 3-amino-1,2,4-triazole upon the metabolism of carbon labeled sodium bicarbonate, glucose, succinate, glycine and serine by bean plants. *Physiol. Plant.*, **14**, p. 62-71.

19. Cercos (A.P.), 1964. — Effects of Etamycin upon seedling growth and chlorophyll production. *Phytopath.*, **54**, p. 741.

20. Charbonnier (J.) et Foucault (G.), 1956. — Sur le catalyseur de polymérisation du méthacrylate de butyle dans l'enrobage de pièces biologiques en vue de l'examen au microscope électronique. *Bull. Micr. Appl.*, **6**, p. 189-190.

21. Comar (C.L.) et Zscheile (F.P.), 1942. — Analysis of plant extracts for chlorophylls a and b by a photoelectric spectrophotometric method. *Plant Physiol.*, **17**, p. 198-209.

22. Crowdy (S.H.), Gardner (D.), Grove (J.-F.) et Pramer (D.), 1955. — The translocation of antibiotics in higher plants. I. Isolation of griseofulvin and chloramphenicol from plant tissue. *J. Exptl. Bot.*, **6**, p. 371-383.

23. Crowdy (S.H.), Grove (J.-F.) et Hemming (H.G.), 1956. — The translocation of antibiotics in higher plants. II. The movement of griseofulvin in broad bean and tomato. *J. Exptl. Bot.*, **7**, p. 42-64.

24. Dangeard (P.A.), 1919. — Sur la distinction du chondriome des auteurs en vacuome, plastidome et sphérome. *C.R.Ac. Sc.*, **169**, p. 1005-1007.

25. Darlington (C.D.) et Mather (K.), 1949. — « The elements of genetics », p. 169-173. G. Allen and Unwin, éd., Londres.

26. De Deken-Grenson (M.), 1954. — Recherches sur le mode d'action de la Streptomycine sur la formation des chloroplastes. *Arch. Intern. Physiol.*, **62**, p. 290-293.

27. De Deken-Grenson (M.), 1955. — Action de la Streptomycine sur la formation des chloroplastes. *Biochim. Biophys. Acta*, **17**, p. 35-47.

28. De Deken-Grenson (M.), 1960. — Le mécanisme de la perte héréditaire d'une fonction biochimique : la synthèse des chlorophylles. *Arch. Biol.*, **71**, p. 270-341.

29. De Deken-Grenson (M.) et Messin (S.), 1958. — La continuité génétique des chloroplastes chez les Euglènes. I. Mécanisme de l'apparition des lignées blanches dans les cultures traitées par la Streptomycine. *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, p. 145-155.

30. Döbel (von P.), 1963. — Untersuchungen des wirkung von Streptomycin, Chloramphenicol, und 2-thiouracil behandlung auf die plastiden wicklung von *Lycopersicum esculentum* Miller. *Biol. Zentralblatt*, **82**, p. 275-295.

31. Douin (R.), 1954. — Chromatographie sur papier des pigments chlorophylliens. 8e Congrès inter. Bot. Paris, Section 11 et 12, p. 458-468.

32. Doutreligne (J.), 1935. — Note sur la structure des chloroplastes. *Proc. Kon. Akad. Weten.*, Amsterdam, **38**, p. 886-896.

33. Duranton (J.), 1964. — Etude de la biogenèse et de la constitution des chloroplastes à l'aide des indicateurs radioactifs. *Physiol. vég.*, **2**, p. 363-408.

34. Dusi (H.), 1953. — La chlorophylle rend les plastes d'une Euglène insensibles à la Streptomycine. *C.R. Ac. Sc.*, **237**, p. 1795-1797.

35. Ebringer (L.), 1962. — Side-effect of Kanamycin on a green Protista. *J. Antibiotics*, **15**, p. 113-114.

36. Ebringer (L,), 1962. — Erythromycin and Streptomycin-like antibiotics as bleaching factors for *Euglena gracilis*. *Naturwiss.*, **49**, p. 334-335.

37. Ebringer (L.), 1962. — Erythromycin-induced bleaching of *Euglena gracilis*. *J. Protozool.*, **9**, p. 373-374.

38. Euler (H. von), 1947. — Einfluss das Streptomycin auf die chlorophyllbildung. *Kemiska arbeten, NyF.*, II, **9**, p. 1.

39. Euler (H. von), 1949. — Antagonistische und aktivierende Wirkungen von Ribonukleinsäure, Streptomycin, Co- und Mg-Ionen bei Samenkeimung und Blutbildung. *Ark. for Kem.*, **1**, p. 263-268.

40. Euler (H. von), 1950. — Einfluss von Streptomycin auf Samen normaler und chlorophylldefekter Gerste. *Z. Naturforschg.*, **5**, p. 448.

41. Euler (H. von), 1953. — Einfluss von Streptomycin und Dihydrostreptomycin auf keimende Samen grüner Pflanzen. *Hoppe-Seyler'S Z. Physiol. Chem.*, **295**, p. 411.

42. Euler (H. von), Bracco (M.) et Heller (L.), 1948. — Les actions de la Streptomycine sur les graines en germination des plantes vertes et sur les polynucléotides. *C.R. Ac. Sc.*, **227**, p. 16-18.

43. Euler (H. von) et Heller (L.), 1950. — Biochemische Wirkungen des Streptomycins und des Streptidins. *Ark. Kem.*, **1**, p. 293-298.

44. Finean (J.B.), Sjöstrand (F.S.) et Steinmann (E.), 1953. — Submicroscopic organisation of some layered lipoprotein structure. *Exptl. Cell Res.*, **5**, p. 557-559.

45. Fredrick (J.F.), 1963. — 3-Amino-1,2,4-triazole interference with biosynthesis of phosphorylase in *Oscillatoria*. *Physiol. Plantarum*, **16**, p. 822-827.

46. Fredrick (J.F.) et Gentile (A.C.), 1960. — The stability constant of the manganese chelate of 3-amino-1,2,4-triazole. *Arch. Biochem. Biophys.*, **91**, p. 178-181.

47. Fredrick (J.F.) et Gentile (A.C.), 1961. — The structure of the D-glucose adduct of 3-amino-1,2,4-triazole : infrared absorption studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, **92**, p. 356-359.

48. Frey-Wyssling (A.), 1937. — Der Aufbau der Chlorophyllkörner. *Protoplasma*, **29**, p. 279-299.

49. Frey-Wyssling (A.) et Kreutzer (E.), 1958. — Die submikroskopische entwicklung der chromoplasten in den blüten von *Ranunculus repens* L., *Planta*, **51**, p. 104-114.

50. Frey-Wyssling (A.) et Kreutzer (E.), 1958. — The submicroscopic development of chromoplasts in the fruit of *Capsicum annuum* L. *J. Ultrastruct. Res.*, **1**, p. 397-411.

51. Frey-Wyssling (A.) et Mühlethaler (K.), 1949. — Über den Feinbau der Chlorophyll-Körner. *Vierteljahresschr. Naturforschg. Ges.* Zürich, **94**, p. 179.

52. Frey-Wyssling (A.), Ruch (F.) et Berger (X.), 1955. — Monotrope Plastiden-Metamorphose. *Protoplasma*, **45**, p. 97-114.

53. Gabe (M.), 1947. — Sur l'emploi du picrate de vert de méthyle pour la différenciation de la coloration d'Altmann. *Bull. Histol. Appl.*, **1**, p. 5-8.

54. Gautheret (R.J.), 1953. — Recherches anatomiques sur les cultures de tissus de rhizomes de Topinambour et d'hybrides de Soleil et de Topinambour. *Rev. Gén. Bot.*, **60**, p. 129-173 et 193-238.

55. Gautheret (R.J.), 1959. — La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations, 863 p., Masson et C^ie^, éd., Paris.

56. Gerola (F.M.), Cristofori (F.) et Dassù (G.), 1959. — Sulla differenziazione e sull'infrastruttura dei cloroplasti di Pisello (*Pisum sativum*). *Atti del II Congresso Italiano di Microscopia elettronica*, 23-24 Marzo 1959).

57. Gerola (F.-M.), Cristofori (F.) et Dassù (G.), 1960. — Ricerche sulle sviluppo dei cloroplasti di Pisello (*Pisum sativum* L.), I. Sviluppo dei cloroplasti in piante cresciute in condizioni di normale alternarsi di luce e di buio. *Caryologia*, **13**, p. 164-178.

58. Gerola (F.M.), Cristofori (F.) et Dassù (G.), 1960. — Ricerche sulle sviluppo dei cloroplasti di Pisello (*Pisum sativum* L.), II. Sviluppo dei cloroplasti in piantine eziolate e loro modificazioni durante il successivo inverdimiento. *Caryologia*, **13**, p. 179-197.

59. Gerola (F.M.), Cristofori (F.) et Dassù (G.), 1960. — Ricerche sulle infrastrutture delle cellule del mesofillo fogliare di piante sane e virosate di Tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Caryologia*, **13**, p. 352-378.

60. Gerola (F.M.) et Dassù (G.), 1960. — Variazioni delle infrastrutture dei cloroplasti di Tobacco (*Nicotana tabacum*). *Caryologia*, **13**, p. 398-410.

61. Gerola (F.M.) et Dassù (G.), 1960. — L'evoluzione dei cloroplasti durante l'inverdimento sperimentale di fragmenti di tuberi di Topinambour (*Helianthus tuberosus*). *Nuovo Giornale Botanico Italiano*, **67**, p. 63-78.

62. Gerola (F.M.), Lalatta (F.) et Cervato (G.), 1962. — Osservazioni citologiche su Peschi clorotici e rinverditi in seguito a traittamenti con soluzioni minerali. *Giorn. Bot. Ital.*, **69**, p. 313-321.

63. Gibor (A.) et Granick (S.), 1962. — Ultraviolet sensitive factors in the cytoplasm that affect the differenciation of *Euglena plastids*. *J. Cell Biol.*, **15**, p. 599-603.

64. Giuliano (R.), Stein (M.L.) et Euler (H. von), 1954. — Die Fällung von Nukleoproteiden, Nukleinsäuren und Nukleotiden durch Dihydrostreptomycin. *Ark. for Kem,*. **6**, p. 565-570.

65. Goodwin (T.W.), 1952. — The comparative Biochemistry of the carotenoids. Chapman and Hall, éd., Londres.

66. Granick (S.), 1961. — The chloroplasts : Inheritance, structure and function. « The Cell », Academic press., éd. New York and London, **2**, p. 489,-595.

67. Granick (S.) et Porter (K.R.), 1947. — The structure of the Spinach chloroplast as interpreted with the electron microscope. *Amer. Journ. Bot.*, **34**, p. 545-550.

68. Gratzy-Wardengg (E.), 1932. — Degeneration von chloroplasten an Farnprothallen. *Protoplasma*, **14**, p. 52-63.

69. Gray (R.A.), 1955. — Inhibition of root growth by Streptomycin and reversal of the inhibition by Manganese. *Amer. Jour. Bot.*, **42**, p. 327-331.

70. Gray (R.A.) et Hendlin (D.), 1956. — Inhibition of growth and chlorophyll formation in plants by O-Methylthreonine. *Plant Physiol.*, suppl. : XXI.

71. Gray (R.A.) et Hendlin (D.), 1962. — Growth inhibition and bleaching in higher plants and *Euglena* by O-Methylthreonine. Reversal by Isoleucine. *Plant Physiol.*, **37**, p. 223-227.

72. Guilliermond (A.), 1911. — Les mitochondries des cellules végétales. *C.R. Ac. Sc.*, **153**, p. 199-202.

73. Guilliermond (A.), 1911. — Sur la formation des chloroleucites aux dépens des mitochondries. *C. R. Ac. Sc.*, **153**, p. 290-292.

74. Guilliermond (A.), 1911. — Sur l'origine des leucoplastes et sur les processus cytologiques de l'élaboration de l'amidon dans le tubercule de Pomme de terre. *C.R. Ac. Sc.*, **153**, p. 1492-1494.

75. Guilliermond (A.) et Gautheret (R.J.), 1933. — Caractères microchimiques des composés oxyflavoniques ; leur localisation dans la vacuole. *C.R. Ac. Sc.*, **196**, p. 369.

76. Guilliermond (A.) et Gautheret (R.J.), 1933. — Nouvelles remarques sur les caractères microchimiques des composés oxyflavoniques et moyens de les distinguer des tanins. *C.R. Soc. Biol.*, **112**, p. 537.

77. Guilliermond (A.) et Gautheret (R.J.), 1940. — Recherches sur la coloration vitale des cellules végétales. *Librairie générale de l'Enseignement*, éd. Paris.

78. Gustafsson (A.), 1940. — The mutation system of the chlorophyll apparatus. *Lunds Univ. Arssk.*, **36**, p. 1-40.

79. Gustafsson (A.), 1942. — The plastid development in various types of chlorophyll mutations. *Hereditas*, **28**, p. 483-492.

80. Gustafsson (A.), 1946. — The origin of *Albina* and *Xantha* mutations in Barley. *Acta Radiol.*, **27**, p. 300-307.

81. Haberlandt (S.), 1888. — Die Chlorophyllkorn der Selaginellen. *Flora*, **71**, p. 291-308.

82. Hall (W.C.), Johnson (S.P.) et Leinweber (C.L.), 1954. — Aminotriazole : A new abscission chemical and growth inhibitor. *Texas Agr. Exptl. Stat. Bull.*, **789**, p. 1-15.

83. Hamner (C.L.) et Tukey (H.B.), 1951. — Chlorophyll inhibition and herbicidal action of 3-(α-iminoethyl)-5-methyl tetronic acid. *Bot. Gaz.*, **112**, p. 525-528.

84. Heitz (E.), 1936. — Gerichtete Chlorophyllscheiben als strukturelle Assimilation seinheiten der Chloroplasten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **54**, p. 363-368.

85. Heitz (E.), 1936. — Untersuchungen über den Bau der Plastiden. I. Die gerichteten Chlorophyllscheiben der Chloroplasten. *Planta*, **26**, p. 134-163.

86. Heitz (E.), 1954. — Kristallgitterstruktur des Granum junger Chloroplasten von *Chlorophytum*. *Exptl. Cell Res.*, **7**, p. 606-608.

87. Heitz (E.), 1956. — Kristallgitterstruktur in den jungen Chloroplasten einer Dikotyledone (*Eranthenum leuconeurum*). *Experientia*, **12**, p. 476-477.

88. Heitz (E.) et Maly (R.), 1953. — Zur Frage der Herkunft der Grana. *Z. Naturforschg.*, **8**, p. 243-249.

89. Hodge (A.J.), Branster (M.), Martin (E.M.), Morton (R.K.), McLean (J.D.) et Mercer (F.V.), 1956. — Effects of the physical environment on some lipoprotein layer systems and observations on their morphogenesis. *J. Biophys. Biochem. Cyt.*, **2**, p. 221-228.

90. Hodge (A.J.), McLean (J.D.) et Mercer (F.V.), 1955. — Ultrastructure of lamellae and grana in the chloroplasts of *Zea mays* L. *J. Biophys. Biochem. Cyt.*, **1**, p. 605-614.

91. Hodge (A.J.), McLean (J.D.) et Mercer (F.V.), 1956. — A possible mechanism for the morphogenesis of lamellar systems in plant cells. *J. Biophys. Biochem. Cyt.*, **2**, p. 597-608.

92. Holm (G.), 1954. — Chlorophyll mutations in barley. *Acta Agricult. Scandinav.*, **4**, p. 457-471.

93. Hurel-Py (G.), 1949. — Sur le bouturage de Sphaignes en milieu aseptique. *Bul. Soc. Bot., Fr.*, **96**, p. 31-32.

94. Hurel-Py (G.), 1950. — Recherches préliminaires sur la culture aseptique des prothalles de Filicinées. *Rev. Gén. Bot.*, **57**, p. 637-681 et 690-736.

95. Jensen (A.), 1960. — Chromatographic separation of carotenes and other chloroplast pigments on Aluminium oxide-containing paper. *Acta Chem. Scand.*, **14**, p. 2051.

96. Jensen (A.) et Jensen (S.L.), 1959. — Quantitative paper chromatography of carotenoids. *Acta Chem. Scand.*, **13**, p. 1863-1868.

97. Kausche (G.A.) et Ruska (H.), 1940. — Zur Frage der Chloroplastenstruktur. *Naturwiss.*, **28**, p. 303-304.

98. Kay (R.E.) et Phinney (B.), 1956. — Plastid pigment changes in the early seedling leaves of *Zea mays* L. *Plant Physiol.*, **31**, p. 226-231.

99. Khudairi (A.K.), 1961. — *Xanthium* leaf pigments and their inhibition by Streptomycin. *Biochim. Biophys. Acta*, **46**, p. 344-354.

100. Kirk (J.T.O.), 1962. — Effect of Streptomycin on greening and biosynthesis in *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, p. 139-151.

101. Kirk (J.T.O.), 1962. — Effect of Streptomycin on (^{14}C) leucine incorporation in *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **59**, p. 476-479.

102. Kirk (J.T.O.) et Juniper (B.E.), 1963. — The effects of Streptomycin in the mitochondria and plastids of Barley. *Exptl. Cell Res.*, **30**, p. 621-623.

103. Klein (S.), 1960. — The effect of low temperature on the development of the lamellar system in chloroplasts. *J. Biophys. Biochem. Cyt.*, **8**, p. 529-538.

104. Klein (S.), 1962. — Phytylation of chlorophyllide and formation of lamellae in chloroplasts. *Nature*, **196**, p. 992-993.

105. Lacharme (J.), 1961. — Mode d'action des tétracyclines sur les divers métabolismes de Phanérogames. Thèse de Doctorat, Lyon, 136 p.

106. Lamprecht (I.), 1961. — Die Feinstruktur der Plastiden von *Tradescantia albiflora* (Kth.) bei Eisenmangelchlorose. *Protoplasma*, **53**, p. 118-147.

107. Lance (A.), 1958. — Infrastructure des cellules du méristème apical et des jeunes ébauches foliaires de *Chrysanthemum segetum* L. (Composés). *Ann. Sc. Nat., Bot.*, 11^{e} série, **19**, p. 165-202.

108. Lance-Nougarède (A.), 1960. — Développement inframicroscopique des chromoplastes au cours de l'ontogenèse des fleurs ligulées de *Chrysanthemum segetum* L. *C.R. Ac. Sc.*, **250**, p. 173-175.

109. Lance-Nougarède (A.), 1960. — Processus inframicroscopique de la régression plastidiale et d'harmonisation de croissance de la pellicule ectoplasmique lors de l'initiation des méristèmes floraux chez *Chrysanthemum segetum* L. (Composées). *C.R. Ac. Sc.*, **250**, p. 3371-3373.

110. Lefort (M.), 1959. — Sur la présence d'un centre plastidial dans les chloroplastes d'*Elodea canadensis*. *Rev. Gén. Bot.*, **66**, p. 461-465

111. Lefort (M.), 1959. — Etude de quelques mutants chlorophylliens induits chez *Lycopersicum esculentum* Mill. *Rev. Cyt. Biol. Vég.*, **22**, p. 1-160.

112. Lefort (M.), 1963. — Etude comparative de certains mutants dépigmentés chez l'*Euglena gracilis* et chez d'autres Algues. *C.R. Ac. Sc.*, **256**, p. 5190-5192.

113. Lefort (M.) et Bourdu (R.), 1964. — Influence de la réanimation nitrique sur l'infrastructure plastidiale de *Bryophyllum Daigremontianum* Berger. *C.R. Ac. Sc.*, **258**, p. 5031-5034.

114. Lefort (M.) et Signol (M.), 1955. — Méthode rapide de séparation des principaux pigments foliaires par chromatographie sur papier. *Rev. Gén. Bot.*, **62**, p. 683-686.

115. Lewitsky (G.A.), 1911. — Vergleichende Untersuchung über die Chondriosomen in lebenden und fixierten Pflanzenzellen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **29**, p. 685-696.

116. Lewitsky (G.A.), 1911. — Die chloroplasten Anlage in lebenden und fixierten Zellen bei *Elodea canadensis* (Rich.), *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **29**, p. 697-703.

117. Leyon (H.), 1953. — The structure of chloroplasts. II. The first differenciation of the chloroplast structure in *Vallota* and *Taraxacum* studied by means of electron microscopy. *Exptl. Cell Res.*, **5**, p. 520-529.

118. Leyon (H.), 1953. — Virus formation in chloroplasts. *Exptl. Cell Res.*, **4**, p. 362-370.

119. Leyon (H.), 1954. — The structure of chloroplasts. IV. The development and structure of the *Aspidistra* chloroplast. *Exptl. Cell Res.*, **7**, p. 265-273.

120. Leyon (H.), 1954. — The structure of chloroplasts. VI. The origin of the chloroplast *Laminae*. *Exptl. Cell Res.*, **7**, p. 609-611.

121. Linser (H.) et Kiermayer (O.), 1957. — Zellphysiologische untersuchungen über die wirkung von 3-aminotriazol und 3-(α-iminoäthyl)-5-methyl-tetronsäure als spezifische chlorophyllbildungshemmstoffe bei *Elodea canadensis*. *Planta*, **49**, p. 498-504.

122. Lwoff (A.) et Schaeffer (P.), 1949. — Remarques sur une analogie structurale entre Streptomycine et chlorophylle. *C.R. Ac. Sc.*, **228**, p. 511-513.

123. Maccalla (D.R.), 1962. — Chloroplasts of *Euglena gracilis* affected by Furadantin. *Science*, **137**, p. 225.

124. Mackinney (G.), 1941. — Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, **140**, p. 315-322.

125. Malkoff (D.B.) et Buetow (D.E.), 1964. — Ultrastructural changes during carbon starvation in *Euglena gracilis*. *Exptl. Cell Res.*, **35**, p. 58-63.

126. Marinos (N.G.), 1963. — Studies on submicroscopic aspect of mineral deficiencies. II. Nitrogen, Potassium, Sulfur, Phosphorus and Magnesium deficiencies in the shoot apex of Barley. *Amer. Jour. Bot.*, **50**, p. 998-1005.

127. Matsui (C.). 1958. — Pathological cytology of Tobacco leaf infected with Tobacco Mosaïc Virus III. *J. Biophys. Biochem. Cyt.*, **4**, p. 831-832.

128. Menke (W.), 1934. — Chloroplastenstudien. II. *Protoplasma*, **22**, p. 56-62.

129. Menke (W.) et Küster (H.J.), 1938. — Dichroismus und Doppelbrechung vergoldeter Chloroplasten. *Protoplasma*, **30**, p. 283-290.

130. Mercer (F.V.), Nittim (H.) et Possingham (J.V.), 1962. — The effect of manganese deficiency on the structure of Spinach chloroplasts. *J. Cell. Biol.*, **15**, p. 379-381.

131 Metzner (P.), 1937. — A demonstration at the 51st general meeting of the Deutschen Botanischen Gesellschaft. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **55**, p. 16.

132. Meyer (A.), 1882. — Über chlorophyllkörner, stärkebildner und farbkörper. *Bot. Zbl.*, **12**, p. 314.

133. Meyer (A.), 1883. — Das chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer Beziehung. Ueber Krystalloide der Trophoplasten und ueber die Chromoplasten der Angiospermen. *Bot. Zeit.*, **41**, p. 489-498, p. 505-514, et p. 525-531.

134. Moreland (D.E.), Gentiner (W.A.), Hilton (J.L.) et Hill (K.L.), 1959. — Studies on the mechanism of herbicidal action of 2-chloro-4,6 bis-(ethyl-amino)-5-triazine. *Plant Physiol.*, **34**, p. 432-435.

135. Moriber (L.G.), Hershenov (B.), Aaronson (S.) et Bensky (B.), 1963. — Teratological chloroplast structures in *Euglena gracilis* permanently bleached by exogenous physical and chimical agents. *J. Protozool.*, **10**, p. 80-86.

136. Mülhethaler (K.), 1955. — Untersuchungen über die Struktur and Entwicklung der Proplastiden. *Protoplasma*, **45**, p. 264-274.

137. Mühlethaler (K.) et Frey-Wyssling (A.), 1959. — Entwicklung und Struktur der Proplastiden. *J. Biophys. Biochem. Cyt.*, **6**, p. 507-512.

138. Murakami (S.), 1960. — Electron Microscope Studies on the Development of Plastids in Variegated *Liriope* Leaves. *J. Electronmicroscopy*, **9**, p. 91-95.

139. Murakami (S.) et Ueda (R.), 1960. — Electron Microscope Studies on the fine Structure of Plastids in Normal an Variegated Tissues in *Liriope* Plant. *Cytologia*, **25**, p. 59-68.

140. Nägeli (C.), 1846. — Zellkerne, Zellbildung und Zellwaschstumbei den Pflanzen. *Zeit. Wiss. Bot.*, **3-4**, p. 22-93.

141. Netien (G.), Carraz (M.) et Sotty (L.), 1952. — De l'action comparée de ls streptomycine et de la dihydrostreptomycine sur la croissance de tissus de Carotte cultivés *in vitro*. *C.R. Soc. Biol.*, **146**, p. 1339-1341.

142. Netien (G.), Hutinel (P.) et Sotty (O.), 1952. — Action de l'Auréomycine et de la Terramycine sur la biogénèse de la chlorophylle au cours de la germination. *C.R. Soc. Biol.*, **146**, p. 1337-1339.

143. Netien (G.) et Lacharme (J.), 1955. — Apparition de pigments anthocyaniques : test d'activité des antibiotiques sur la plantule de Radis. *C.R. Ac. Sc.*, **240**, p. 692-694.

144. Newcomer (E.), 1946. — Concerning the duality of the mitochondria and the validity of the osmiophilic platelets in plants. *Amer. Jour. Bot.*, **33**, p. 684-697.

145. Newcomer (E.), 1951. — Mitochondria in plants. *Bot. Rev.*, **17**, p. 53-89.

146. Nichols (P.), 1962. — The reaction between aminotriazole and catalase. *Biochim. Biophys. Acta*, **59**, p. 414-420.

147. Nickell (L.G.) et Finlay (C.), 1954. — Antibiotics and their effects on plant growth. *Agr. Food Chem.*, **2**, p. 178-182.

148. Nougarède (A.), 1964. — Evolution infrastructurale des chromoplastes au cours de l'ontogenèse des pétales chez le *Spartium junceum*. L. (Papilionacées). *C.R. Ac. Sc.*, **258**, p. 683-685.

149. Nunez (G.), 1954. — Chromatographie de partage des substances liposolubles. II. Chromatographie sur papier des caroténoides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**, p. 411-413.

150. Nybom (N.), 1954. — Mutation types in Barley. *Acta Agr. Scand.*, **4**, p. 430-456.

151. Palade (G.E.), 1952. — A study for electron microscopy. *J. Exp. Med.*, **95**, p. 285-298.

152. Pensa (A.), 1910. — Alcune formazioni endocellulare nei vegetali. *Anat. Anzeiger.*, **37**, p. 325-333.

153. Perner (E.S.), 1956. — Die ontogenetische Entwicklung der Chloroplasten von *Chlorophytum comosum*. *Z. Naturforschg.*, **11**., p. 560-573.

154. Perner (E.S.), 1956. — Die Ontogenese der Chloroplasten von *Chlorophytum comosum*. *Proc. Stockholm Conference on electron Microscopy*, p. 272-273.

155. Popov (M.D.), 1959. — L'influence de la pénicilline sur la formation des racines de boutures de certaines plantes. *C.R. Ac. bulg. Sc.*, **12**, p. 65-68.

156. Porter (J.W.) et Lincoln (R.E.), 1950. — I. *Lycopersicum* selections containing a high content of carotenes and colorless polyens. II. The mechanism of carotens biosynthesis. *Arch. Biochem.*, **27**, p. 390-403.

157. Pramer (D.), 1953. — Observations on the uptake and translocation of five actinomycete antibiotics by Cucumer seedlings. *Ann. Appl. Biol.*, **40**, p. 617-622.

158. Pramer (D.), 1955. — Absorption of antibiotics by plant cells. *Science*, **121**, p. 507-508.

159. Pramer (D.) et Wright (J.M.), 1955. — Some phytotoxic effects of five actinomycete antibiotics. *The Plant Disease Reporter*, **39**, p. 118-119.

160. Pringsheim (E.G.), 1948. — The loss of chromatophores in *Euglena gracilis*. *New Phyt.*, **47**, p. 52-87.

161. Pringsheim (E.G.), 1958. — Die apoplastidie bei *Euglena*. *Rev. Algologique*, nelle série, **4**, p. 41-56.

162. Pringsheim (E.G.) et Pringsheim (O.), 1952. — Experimental elimination of chromatophores and eye-spot in *Euglena gracilis*. *New Phytol.*, **51**, p. 65-76.

163. Provasoli (L.), Hutner (S.H.) et Schatz (A.), 1948. — Streptomycin-Induced Chlorophyll-less Races of *Euglena*. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **69**, p. 279-282.

164. Renner (O.), 1924. — Die Schecklung der *Oenothera* Bastarde. *Biol. Zbl.*, **44**, p. 309-336.

165. Renner (O.), 1934. — Die pflanzlichen Plastiden als selbständige Elemente der genetischen Konstitution. *Ber. Math. Phys. Kl, Scähs. Akad. Wiss.* Leipzig, **86**, p. 241-266.

166. Renner (O.), 1936. — Zur Kenntnis der nichtmendelnden Buntheit der Laubblätter. *Flora*, **30**, p. 218-290.

167. Rhoades (M.M.), 1946. — Plastids mutations. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **11**, p. 202-207.

168. Rhoades (M.M.) et Carvalho (A.), 1944. — The function and structure of the parenchyma sheath plastids of the Maize leaf. *Bull. Torrey Bot. Club.*, **71**, p. 335-346.

169 Rosen (W.G.), 1954. — Effects of Streptomycin on certain Green Plants. *The Ohio Jour. Sc.*, **54**, p. 73-78.

170. Rosen (W.G.) et Gawlik (S.R.), 1961. — Effect of Streptomycin on chlorophyll accumulation in *Euglena gracilis*. *J. Protozool.*, **8**, p. 90-96.

171. Rossner (W.), 1960. — Licht-und elektronenoptische Untersuchungen über den Einfluss von Streptomycin auf *Sinapis alba* L. *Protoplasma*, **52**, p. 580-610.

172. Rossner (W.), 1963. — Der einfluss von Streptomycin auf Cyanophyceen. II. Elektronenmikroskopische untersuchungen an *Phormidium minnesotense* (Tilden) Drouet. *Planta*, **60**, p. 166-177.

173. Rubin (B.A.) et Ladygina (M.E.), 1960. — En russe : (L'Influence de la streptomycine sur les processus d'oxydation des plantules d'Orge). *Biokhimija S.S.S.R.*, **25**, p. 617-623.

174. Sato (Y.), 1960. — Effect of Streptomycin on the chlorophyll formation in the Timothy. II. Influence of inorganic salts upon the streptomycin effect on the Timothy seeds (under a resting condition). *Keio Jour. Med.*, **9**, p. 25-32.

175. Sato (Y.), 1962. — Effects of Streptomycin on the chlorophyll formation in the Timothy. IV. Further studies on the action of metal salts and pH values upon the Streptomycin treated seeds. *Keio Jour. Med.*, **10**, p. 99-107.

176. Schaeffer (P.), 1952. — Recherches sur le métabolisme bactérien des cytochromes et des porphyrines. IV. Effets de la carence en streptomycine sur des mutants bactériens streptomycino-exigeants. *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, p. 563-571.

177. Schimper (A.F.W.), 1882. — Über die Gestalt der Stärkebildner und Farbkörper. *Bot. Zbl.*, **12**, p. 175-178.

178. Schimper (A.F.W.), 1883. — Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot. Zeit.* **41**, p. 105-112, p. 121-131, p. 137-146 et p. 153-162.

179. Schimper (A.F.W.), 1885. — Untersuchungen über die Chlorophyllkörper und die ihnen homologen Gebilde. *Jahrb. Wiss. Bot.*, **16**, p. 1-247.

180. Schopfer (W.H.), Bein (M.) et Besson (G.), 1951. — Action de la Streptomycine et de la Chloromycétine sur la biogenèse des caroténoïdes chez *Pisum*. *Act. Soc. Helv. Sc. Nat.*, **131**, p. 148-149.

181. Schopfer (W.H.), Grob (E.) et Besson (G.), 1952. — Recherches sur les inhibiteurs du développement et de la biogenèse des caroténoïdes. III. L'acide 3-(α-iminoéthyl)-5-méthyltétronique. *Arch. Sc. Phys. Nat.*, **5**, p. 5-9.

182. Schopfer (W.H.), Grob (E.), Besson (G.) et Keller (V.). 1952. — Recherches sur les inhibiteurs du développement et de la biogenèse des caroténoïdes. I. La Streptomycine. *Arch. Sc. Phys. Nat.*, **5**, p. 1-4.

183. Seybold (A.) et Eagle (K.), 1939. — Zur chromatographischen methode der Blattpigments. *Planta*, **29**, p. 114-118.

184. Siegesmund (K.A.), Rosen (W.G.) et Gawlik (S.T.), 1962. — Effects of darkness and of Streptomycin on the fine structure of *Euglena gracilis*. *Amer. Jour. Bot.*, **49**, p. 137-145.

185. Signol (M.), 1954. — Etude des modifications cytologiques induites par la dihydrostreptomycine chez les plantules d'Orge. *C.R. Soc. Biol.*, **148**, p. 263-265.

186. Signol (M.), 1954. — Action de la dihydrostreptomycine sur la croissance et la pigmentation de plantules d'Orge. *C.R. Soc. Biol.*, **148**, p. 646-648.

187. Signol (M.), 1958. — Modifications cytologiques et pigmentaires induites par l'acide 3-(α-iminoéthyl)-5-méthyltétronique chez le Maïs. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles*, **3-4**, p. 360-367.

188. Signol (M.), 1961. — Action de l'acide 3-(α-aminoéthyl)-5-méthyltétronique sur l'infrastructure des chloroplastes de *Zea mays* (L.), *C.R. Ac. Sc.*, **252**, p. 1645-1646.

189. Signol (M.), 1961. — Comparaison de l'action de la dihydrostreptomycine à celle de l'acide 3-(α-iminoéthyl)-5-méthyltétronique sur l'infrastructure des chloroplastes de *Zea mays* (L.). *C.R. Ac. Sc.*, **252**, p. 1993-1995.

190. Signol (M.), 1961. — Action du rythme nycthéméral sur la formation du granum primaire au cours de la différenciation des chloroplastes de *Zea mays* (L.). *C.R. Ac. Sc.*, **252**, p. 4177-4179.

191. Sironval (C.), 1953. — A propos de la chromatographie sur papier de la chlorophylle et des caroténoïdes des feuilles. *Arch. Intern. Phys.*, **41**, p. 563.

192. Sironval (C.), 1954. — Mesure de l'activité de la chlorophyllase par chromatographie sur papier. *Physiol. Plantarum*, **7**, p. 523-630.

193. Sironval (C.) et Wolwertz (M.R.), 1963. — Quelques particularités du métabolisme des chlorophylles. *Coll. Intern. C.N.R.S.* (Paris) ; *La Photosynthèse*, p. 317-342.

194. Smith (W.J.), 1946. — Effect of Penicillin on seed germination. *Science*, **104**, p. 411.

195. Smith (J.H.C.) et Young (V.M.K.), 1956. — Chlorophyll formation and accumulation in plants. In « Radiation Biology ». (A. Hollaender), **3**, p. 393-442 McGraw-Hill éd., New York.

196. Sossountzov (I.), 1953. — Action de l'hydrazide maléique sur le développement *in vitro* des prothalles de Fougères. Morphologie des prothalles et proportions des types prothalliens. *C.R. Soc. Biol.*, **147**, p. 605-608.

197. Sotty (O.), 1955. — Recherches expérimentales sur la croissance des plantes en présence d'antibiotiques. Thèse Fac. Méd. et Pharmacie, Lyon, 107 p.

198. Soyerman (A.), 1963. — Action de la pénicilline sur la régénération des prothalles de *Gymnogramme calomelanos var. argentea*. *C.R. Ac. Sc.*, **257**, p. 957-960.

199. Soyerman (A.), 1964. — Action de la pénicilline sur la taille des colonies prothalliennes de *Gymnogramme calomelanos var. argentea*, et sur les dimensions des parois des prothalles régénérés. *C.R. Ac. Sc.*, **258**, p. 2157-2159.

200. Spotts (C.R.) et Stanier (R.Y.), 1961. — Mechanism of streptomycin action on Bacteria : a unitary hypothesis. *Nature*, **162**, p. 633-637.

201. Srivastava (M.G.), 1958. — XIII. Cytological responses of plants to aminotriazole. *Trans. Bose Inst. Calcutta*, **21**, p. 119-127.

202. Steinmann (E.), 1952. — Contribution to the structure of granular chloroplasts. *Experentia*, **8**, p. 300-301.

203. Steinmann (E.), 1952. — An electron microscope study of lamellar structure of chloroplasts. *Exptl. Cell Res.*, **3**, p. 367-372.

204. Steinmann (E.) et Sjöstrand (F.S.), 1955. — The ultrastructure of chloroplast. *Exptl. Cell Res.*, **8** p. 15-23.

205. Strugger (S.), 1951. — Die strukturordnung im chloroplasten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **64**, p. 69-83.

206. Strugger (S.), 1953. — Über die Struktur der Proplastiden. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **66**, p. 439-453.

207. Strugger (S.), 1954. — Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus* l'Herit. *Protoplasma*, **43**, p. 120-173.

208. Strugger (S.), 1957. — Elektronenmikroskopische beobachtungen an den proplastiden des vegetationskegels von *Elodea densa*. *Protoplasma*, **48**, p. 360-364.

209. Strugger (S.) et Perner (E.), 1956. — Beobachtungen zur Frage der ontogenetischen Entwicklung des somatischen Chloroplasten. *Protoplasma*, **46**, p. 711-742.

210. Strunk (C.) et Wartenberg (H.), 1960. — Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Chloroplasten chlorotischer Maïs-pflanzen. *Phytopath. Zeit.*, **38**, p. 109-122.

211. Stubbe (W.) et Wettstein (D. von), 1955. — Zur Struktur erblich verschiedener Chloroplasten von *Oenothera*. *Protoplasma*, **45**, p. 241-250.

212. Sund (K.A.) et Little (H.N.), 1960. — Effect of 3-amino-1,2, 4-triazole on the synthesis of riboflavin. *Science*, **132**, p. 622.

213. Takashima (S.), 1952. — Chlorophyll-Lipoprotein obtained in Crystals. *Nature*, **169**, p. 182-183.

214. Tanaka (N.) et Sato (S.), 1952. — Effects of Streptomycin on the mitotic cells of *Tradescantia paludosa*. *Cytologia*, **17**, p. 124-133.

215. Thomson (W.W.) et Weier (T.E.), 1962. — The fine structure of chloroplasts from mineral-deficient leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Amer. Jour. Bot.*, **49**, p. 1047-1055.

216. Tswett (M.), 1906. — Physikalisch-chemische Studien über das chlorophyll. Die Absorptionen. *Ber Dtsch. Bot. Ges.*, **24**, p. 316-323.

217. Tswett (M.), 1906. — Adsorptionsanalyse und chromatographische methode-anwendung auf die chemie des chlorophylls. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **24**, p. 384-393.

218. Ventura (M.) et Perini (G.), 1953. — Prime osservazioni sull'azione di alcuni antibiotici sui vegetali. *Ann. Bot. Ital.*, **24**, p. 362-371.

219. Virgin (H.I.), Kahn (A.) et Wettstein (D. von). 1963. — The physiology of chlorophyll formation in relation to structural changes in chloroplasts. *Photochem. Photobiol.*, **2**, p. 83-91. Pergamon Press, éd., Londres.

220. Wehrmeyer (W.), 1959. — Licht-und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Cytologie tabakmosaikvirus-infizierter Tabakpflanzen. *Protoplasma*, **51**, p. 242-264.

221. Wehrmeyer (W.) et Perner (E.), 1962. — Der submikroskopische bau der grana in den chloroplasten von *Spinacia oleracea* L. *Protoplasma*, **54**, p. 573-593.

222. Weier (E.), 1936. — The structure of the non-starch containing Beet chloroplast *Amer. Jour. Bot.*, **23**, p. 645-652.

223. Wettstein (D von), 1957. — Chlorophyll-letale und der submikroskopische formwechsel der plastiden. *Exptl. Cell Res.*, **12**, p. 427-506.

224. Wettstein (D. von), 1958. — The formation of plastid structures. *Brookhaven Symp. in Biol.*, **11**, p. 138-159.

225. Willstätter (R.) et Stoll (A.), 1913. — Untersuchungen über die Assimilation der über Chlorophyll. *Julius Springer* éd., Berlin.

226. Wilson (G.B.), 1950. — Cytological effects of some antibiotics *J. Hered.*, **41**, p. 226-231.

227. Wilson (G.B.) et Bowen (C.C.), 1951. — Cytological effects of some more antibiotics. *J. Hered.*, **42**, p. 251-255.

228. Wolken (J.J.), 1956. — A molecular morphology of *Euglena gracilis* var. *bacillaris*. *J. Protozool.*, **3**, p. 211-221.

229. Zahalsky (A.C.), Hutner (S.H.), Keane (M.) et Burger (R.M.), 1962. — Bleaching *Euglena gracilis* with antihistamines and Streptomycin-type antibiotics. *Arch. Mikrobiol.*, **42**, p. 46-55.

230. Zechmeister (L.), 1960. — Cis-trans Isomeric Carotenoid Pigments. *Fortschr. Chem. Org. Naturst., Osterr.*, **18**, p. 223-349.

231. Zechmeister (L.) et Wallcave (L.), 1953. — A Study of some cis-trans Isomeric dehydro-β-carotenes. *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, p. 5341-5344.

232. Zscheile (F.P.) et Comar (C.L.), 1941. — Influence of preparative procedure on the purety of chlorophyll components as shown by absorption spectra. *Bot. Gaz.*, **102**, p. 463-481.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 5

HISTORIQUE 9

CHAPITRE PREMIER : **ACTION DES ANTIBIOTIQUES ET DES SUBSTANCES ANTICHLOROPHYLLIENNES SUR LES VEGETAUX** 11

I. — ACTION DES ANTIBIOTIQUES 11
A. Sur la croissance et la morphogenèse. 11
1) Inhibition 11
2) Stimulation 12
B. Sur la pigmentation 13
C. Sur les structures intracellulaires 15
II. — MODE D'ACTION DE LA STREPTOMYCINE 15
III. — ACTIONS D'AUTRES SUBSTANCES PROVOQUANT DES CHLOROSES VÉGÉTALES 17
IV. — CONCLUSIONS 18

CHAPITRE II : **LES CHLOROPLASTES** 20

I. — STRUCTURE, ORIGINE, DÉVELOPPEMENT. 20
A. Observations en microscopie photonique..... 20
B. Recherches actuelles en microscopie électronique. 22
1) La structure des chloroplastes. 23
2) Origine et différenciation des chloroplastes 24
II. — ÉVOLUTION ET MODIFICATION DES CHLOROPLASTES SOUS L'ACTION DE DIVERS FACTEURS..... 26
A. Modifications naturelles 26
B. Modifications induites par divers facteurs externes. 28
1) Facteurs physiques. 28
2) Facteurs chimiques 29
3) Modifications pathologiques 31

CHAPITRE III : **ETUDE DES PIGMENTS DES PLASTES** .. 32

I. — SÉPARATION DES PIGMENTS FOLIAIRES..... 32
II. — HYPOTHESES ACTUELLES SUR LES ÉTAPES DE LA BIOSYNTHESE DES PIGMENTS 33
A. Chlorophylles 33
B. Caroténoïdes 33

Pages

MATERIELS ET TECHNIQUES 37

CHAPITRE PREMIER : TECHNIQUES DE CULTURE ET DE TRAITEMENT DU MATERIEL BIOLOGIQUE 39

I. TECHNIQUES DE CULTURE 39

A. Culture de plantules 39

B. Culture de tissus et d'organes 40

C. Culture de microorganismes 40

II. — TRAITEMENT DU MATÉRIEL BIOLOGIQUE PAR DIVERSES SUBSTANCES 41

CHAPITRE II : TECHNIQUES CYTOLOGIQUES 42

I. — ÉTUDES CYTOLOGIQUES AU MICROSCOPE PHOTONIQUE 42

A. Observations vitales 42

B. Techniques de fixation, d'inclusion et de coloration. 43

C. Techniques cytochimiques 43

II. — ÉTUDES CYTOLOGIQUES AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE 43

CHAPITRE III : TECHNIQUES D'EXTRACTION, DE SEPARATION ET DE DOSAGE DES PIGMENTS PLASTIDIAUX.. 45

I. EXTRACTION 45

II. — SÉPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE 46

III. DOSAGE DES PIGMENTS 48

RECHERCHES PERSONNELLES 51

CHAPITRE PREMIER : MODIFICATIONS DE LA CROISSANCE ET DE LA PIGMENTATION DE PLANTULES, D'ORGANES OU DE TISSUS DIVERS SOUS L'ACTION DE DIFFERENTS ANTIBIOTIQUES OU COMPOSES ANTICHLOROPHYLLIENS 51

I. — MODIFICATIONS PROVOQUÉES PAR LA STREPTOMYCINE (SM) ET LA DIHYDROSTREPTOMYCINE (DSM). 51

A. Végétaux supérieurs 52

1) Végétaux entiers 52

a. *Orge.* 52

b. *Maïs* 58

c. *Pois* 59

d. *Résumé et Conclusions* 61

2) Cultures de tissus 62

a. *Tissus de Carotte* 62

b. *Ensemencement primaire de rhizome de Topinambour.* 63

c. *Conclusions.* 65

B. Végétaux inférieurs 65

1) Prothalles de Fougères 66

2) Gamétophytes de Sphaignes 67

3) Algues unicellulaires. 67

C. Résumé et conclusions 68

Pages

II. — AUTRES SUBSTANCES 70
A. Tétracyclines 70
1) Auréomycine 70
2) Terramycine 72
B. Acide 3-(α-iminoéthyl)-5-méthyltétronique (AAMT). 72
1) Maïs 72
2) Orge 74
3) Chlamydomonas 74
C. Aminotriazole (AT) 75
D. Pénicilline 75
E. Résumé et conclusions 76

CHAPITRE II : **ETUDE DE QUELQUES MODIFICATIONS DES PIGMENTS FOLIAIRES DE MAIS ET D'ORGE SOUS L'ACTION DE COMPOSES ANTICHLOROPHYLLIENS** .. 77

I. — LES PIGMENTS FOLIAIRES DE PLANTULES NORMALES DE MAIS ET D'ORGE 77
A. Analyse qualitative des pigments des feuilles de plantules de maïs et d'orge 77
B. Analyse quantitative des pigments foliaires de maïs 78

II. — VARIATIONS DE LA TENEUR EN PIGMENTS INDUITES PAR LA DIHYDROSTREPTOMYCINE (DSM) L'ACIDE 3-(α-IMINOÉTHYL)-5-METHYLTETRONIQUE (AAMT) ET L'AMINOTRIAZOLE (AT) 81
A. Dihydrostreptomycine (dsm) 82
1) Analyse qualitative des modifications pigmentaires. 82
2) Analyse quantitative des mofidications pigmentaires. 83
B. Acide 3-(α-iminoéthyl)-5-méthyltétronique (aamt)... 85
1) Analyse qualitative des modifications pigmentaires. 85
2) Analyse quantitative des modifications pigmentaires. 85
C. Aminotriazole (at) 88
1) Analyse qualitative des modifications pigmentaires... 88
2) Analyse quantitative des modifications pigmentaires. 88
D. Conclusions 88

III. — ESSAIS D'IDENTIFICATION DE NOUVEAUX PIGMENTS APPARUS DANS LES FEUILLES DE MAIS SOUS L'ACTION DE L'ACIDE 3-(α-IMINOÉTHYL)-5-MÉTHYLTÉTRONIQUE (AAMT) 89

IV. — RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS 92

CHAPITRE III : **ETUDE EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE DES MODIFICATIONS CYTOLOGIQUES INDUITES PAR DIVERSES SUBSTANCES ANTIBIOTIQUES OU ANTICHLOROPHYLLIENNES** 94

I. — ACTION DE LA DIHYDROSTREPTOMYCINE (DSM).. 94
A. Végétaux supérieurs 94
1) Végétaux entiers. 94
a. *Orge et Maïs.* 94
b. *Pois* 97
2) Cultures de tissus 99
a. *Tissus de Carotte.* 99
b. *Tissus de parenchyme vasculaire de Topinambour.* 99
α. *Modifications observées dans les explantats primaires.* 99

β. *Modifications observées au cours de l'établissement de la souche dépigmentée* 103
γ. *Conclusions* 104
3) Résumé. 105
B. Végétaux inférieurs 106
1) Prothalles de Fougères 106
2) Autres végétaux inférieurs 108
3) Résumé. 108
C. Résumé et conclusions 109
II. ACTION D'AUTRES SUBSTANCES 110
A. Acide 3-(α-iminoéthyl)-5-méthyltétronique (AAMT).. 110
B. Autres substances 112
1) Tétracyclines 112
2) Aminotriazole (AT) 112
3) Pénicilline 113
C. Résumé et conclusions 114

CHAPITRE IV : **ETUDE CYTOLOGIQUE DE LA DIFFERENCIATION DES CHLOROPLASTES DANS LES PLANTULES DE MAIS** 115

I. — STRUCTURE DES CHLOROPLASTES DIFFÉRENCIÉS. 115
II. — ÉTUDE EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE ET ÉLECTRONIQUE DES PRINCIPAUX STADES DE LA DIFFÉRENCIATION DES CHLOROPLASTES 116
A. Etude de la différenciation des chloroplastes dans une même feuille de la base au sommet 118
1) Microscopie photonique 118
2) Microscopie électronique 119
B. Variations du processus de différenciation des plastes au cours de la journée 122
C. Résumé et conclusions 123

CHAPITRE V : **ETUDE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE DES MODIFICATIONS DE L'ULTRASTRUCTURE PLASTIDIALE INDUITES PAR LA DIHYDROSTREPTOMYCINE (DSM) ET L'ACIDE 3-(α-IMINOETHYL)-5-METHYLTETRONIQUE (AAMT).** 125

I. — ACTION DE LA DIHYDROSTREPTOMYCINE (DSM).. 125
II. — ACTION DE L'ACIDE 3-(α-IMINOÉTHYL)-5-MÉTHYLTÉTRONIQUE (AAMT) 129
III. — CONCLUSIONS 132

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES 134
I. CROISSANCE ET MORPHOGENÈSE 134
II. PIGMENTATION ET TENEUR EN PIGMENTS 135
III. MORPHOLOGIE DES CHLOROPLASTES 137
IV. — STRUCTURE FINE ET DIFFÉRENCIATION DES CHLOROPLASTES DE MAIS 140
V. — ACTION DE LA DIHYDROSTREPTOMYCINE (DSM) ET DE L'ACIDE 3-(α-IMINOÉTHYL)-5-MÉTHYLTÉTRONIQUE (AAMT) SUR LA STRUCTURE FINE DES CHLOROPLASTES DE MAIS 142
VI. — CONCLUSIONS 144

BIBLIOGRAPHIE 147

EXPLICATION DES PLANCHES

Toutes les photographies, sauf celle de la planche II, proviennent de coupes pratiquées dans des échantillons fixés par l'acide osmique. La photographie de la planche II correspond à un échantillon fixé au permanganate de potassium.

Abréviations :

a : amidon ; ch : chondrioconte ; cp : chloroplaste ; cr : crête de mitochondrie ; d : dictyosome ; dp : « dense particule » ; e : ergastoplasme ; ft : faisceau de tubules ; ge : granum embryonnaire ; gl : granulation lipidique ; go : globule osmiophile ; gp : granum primaire ; gr : granum ; i : invagination ; l : lamelle de stroma ou lamelle intergrana ; la : lacune ; m : membrane double limitant le plaste ; mi : mitochondrie ; mn : membrane nucléaire ; mp : membrane pecto-cellulosique ; n : noyau ; nu : nucléole ; p : plaste ; pl : plasmodesme ; pn : pore nucléaire ; pp : proplaste ; s : stroma ; v : vacuole ; ve : vésicule ; va : vésicules alignées ; vg : vésicules groupées.

La longueur du trait figurant en bas à gauche de chaque photographie représente 0,2 μ.

PLANCHE I

Fig. 1. — Coupe longitudinale d'un chloroplaste à grana du parenchyme lacuneux d'une feuille bien développée de plantule de Maïs.

Dans le chloroplaste, limité par la double membrane (m), on observe un double système lamellaire : les longues lamelles intergrana, ou lamelles de stroma (l) et les courts saccules, empilés les uns sur les autres, des grana (gr.). Dans le stroma (s) finement granuleux, entre les lamelles intergrana, sont dispersés des globules osmiophiles (go). Dans la partie périphérique du stroma, on remarque sous la membrane limitant le plaste, quelques lamelles très fines irrégulières (flèche). (Grossissement : 26.000).

Fig. 2. — Coupe longitudinale d'un chloroplaste sans grana du parenchyme périvasculaire d'une feuille bien développée de plantule de Maïs.

On ne trouve, dans ce type de chloroplaste, que des lamelles de stroma (l), ainsi que quelques lamelles fines et irrégulières à la périphérie du plaste (flèche). Un examen attentif permet toutefois de déceler par places quelques courts saccules (ge) ressemblant à des « embryons » de grana. Quelques globules osmiophiles (go) et de volumineuses enclaves amylifères (a) sont dispersées dans le stroma. (Grossissement : 34.000).

PLANCHE II

Détail de la structure fine d'un chloroplaste à grana.

On voit nettement (flèches) que les lamelles intergrana (l) s'insèrent entre les saccules constituant les grana (g). (Grossissement : 86.000).

PLANCHE III

Fig. 1. — Coupe pratiquée dans la région la plus indifférenciée de la base de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de huit jours (niveau 1).

Les mitochondries (mi) possèdent quelques crêtes formées par invagination du feuillet interne de la double membrane limitante (cr.). Les proplastes (pp) ne s'en distinguent difficilement que grâce à un stroma plus dense par places, contenant quelques vésicules (ve), dont certaines s'alignent (va). Il est difficile de savoir si l'organite occupant le centre du cliché appartient à l'une ou l'autre de ces catégories (Grossissement : 70.000).

Fig. 2. — Coupe intéressant une région encore méristématique de la deuxième feuille à 1 mm environ au-dessus du méristème (niveau 2).

Les mitochondries (mi) sont toujours pauvres en crêtes, tandis que le proplaste plus gros, de forme irrégulière, s'en distingue nettement par la présence de vésicules internes (ve). (Grossissement : 35.000).

PLANCHE IV

Fig. 1. — Proplastes (pp) au début de leur différenciation dans les cellules de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs, à 4 mm environ du méristème basal (niveau 3). Les vésicules formées par invagination du feuillet interne de la double membrane limitant le proplaste commencent à s'aligner (va). (Grossissement : 34.000).

Fig. 2. — Proplastes au même niveau que dans la fig. 1. Certaines des vésicules du proplaste de la cellule supérieure se soudent déjà. Dans le proplaste de la cellule inférieure, on observe l'édification de grana sans que des lamelles intergrana soient formées (Grossissement : 68.000).

PLANCHE V

Partie de cellule de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de huit jours, à 8 mm environ du méristème basal (niveau 4).

Les mitochondries (mi) sont toujours pauvres en crêtes, tandis que les proplastes sectionnés de différentes manières montrent un stroma granuleux opaque aux électrons (1, 2, 3, 4, 5, 6). Le système lamellaire interne de ces derniers organites se développe ; l'ordre d'apparition des lamelles intergrana et des grana ne semble pas défini de manière précise. Le proplaste 2 très long, en cours d'étirement et de division, contient deux vésicules amylifères. Il faut noter, dans le nucléole du noyau, la présence de « particules denses » que divers auteurs ont déjà signalées. (Grossissement : 30.000).

PLANCHE VI

Proplastes provenant de la région de la deuxième feuille identique à celle de la planche V (niveau 4). (Grossissement : 68.000).

Fig. 1. — Coupe longitudinale d'un proplaste. On y observe des vésicules alignées (va) qui se soudent et donnent des lamelles de stroma (l). Simultanément des grana (gr) sont en cours d'édification.

Fig. 2. — Coupe transversale d'un même proplaste. Des lamelles intergrana (l) sont édifiées par coalescence des vésicules provenant de l'invagination (i) du feuillet interne de la double membrane limitant le proplaste. Ici on n'observe pas de grana.

PLANCHE VII

Proplastes de cellules situées à 8 mm environ du méristème basal de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de huit jours (niveau 4).

Fig. 1. — Le proplaste (pp) se distingue parfaitement de la mitochondrie (mi) par sa taille élevée, par sa structure lamellaire interne différente des crêtes mitochondriales et par son stroma très opaque aux électrons. On remarque que, dans ce proplaste, les grana s'édifient en même temps que les lamelles intergrana. (Grossissement : 69.000).

Fig. 2. — Dans les proplastes (pp) observés, des grana s'édifient alors que les lamelles intergrana ne sont encore qu'à l'état de vésicules alignées (va). Les grains d'amidon (a) sont entourés de chaînettes de vésicules. (Grossissement : 43.000).

PLANCHE VIII

Fig. 1. — Proplaste du mésophylle d'une cellule située à 20 mm environ du méristème de la base de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de huit jours (niveau 5).

A ce stade de développement, le proplaste peut être considéré comme un jeune chloroplaste (p). Les ébauches de grana sont nombreuses et les lamelles intergrana nettement individualisées. Les crêtes des mitochondries (mi) deviennent plus nombreuses. (Grossissement : 65.000).

Fig. 2. — Partie de cellule du niveau 6 à 60 mm de la base de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de huit jours.

Dans ces cellules à différenciation très active, les mitochondries (mi) édifient de nombreuses crêtes internes par invagination du feuillet interne de la membrane double les limitant. Certaines s'allongent en formant des chondriocontes (ch.) (Grossissement : 52.000).

PLANCHE IX

Chloroplastes, ayant presque achevé leur différenciation, des cellules du niveau 6 de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de huit jours (à 60 mm du méristème de base).

Fig. 1. — Coupe longitudinale de chloroplaste à grana du mésophylle.

Les lamelles intergrana (l) et les grana (gr) sont bien différenciés. Lorsque leur disposition se sera régularisée, le chloroplaste aura achevé son développement. (Grossissement : 22.000).

Fig. 2. — Coupe transversale d'un chloroplaste à grana du parenchyme périvasculaire.

Le système lamellaire du chloroplaste est constitué essentiellement de longues lamelles de stroma. Un examen attentif permet toutefois de déceler des ébauches de grana (gr) dont le développement semble avoir été inhibé. Dans le stroma granuleux, si l'on peut observer quelques globules osmiophiles (go), on ne distingue pas encore de vésicules amylifères. (Grossissement : 13.000).

PLANCHE X

Fig. 1. — Cellule non différenciée du méristème basal de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de huit jours (niveau 1).

On ne distingue que très difficilement les proplastes (pp) des mitochondries, grâce à des vésicules internes (ve) dont certaines s'alignent (va). Il n'y existe pas de granum primaire. Les mitochondries (mi) ne possèdent que de petites crêtes périphériques. (Grossissement : 86.000).

Fig. 2. — Proplaste présentant un début de différenciation dans les cellules du niveau 2 (à 2 mm du méristème de base) de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs, fixée au temps 0 (fin de la période obscure).

On remarque dans le proplaste (pp) dont l'étranglement indique un début de division, un amas de vésicules, anastomosées en réseau, constituant le granum primaire (gp). (Grossissement : 69.000).

PLANCHE XI

Fig. 1 et 2. — Proplastes de cellules situées à 4 mm du méristème de base de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs (niveau 3) ; fixation au temps 0 (fin de la période obscure).

Le granum primaire (gp), rejeté latéralement dans le proplaste (pp), est en relation avec des vésicules alignées (va) ou des lamelles en voie d'édification (l). (Grossissement : 69.000).

PLANCHE XII

Fig. 1. — Proplaste de cellules situées à 8 mm environ du méristème de base de la deuxième feuille, fixation au temps 0 (fin de la période obscure).

Dans le proplaste (pp) qui possède un système de lamelles bien différenciées (l), on n'observe que quelques vésicules groupées à l'extrémité du proplaste (vg), les autres étant déjà alignées. (Grossissement : 70.000).

Fig. 2. — Proplaste de cellules situées à 4 mm environ du méristème de base de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de huit jours fixée après quatre heures d'éclairement.

Le granum primaire très réduit donne naissance à des lamelles (l) par alignement et coalescence de vésicules (va). (Grossissement : 35.000).

PLANCHE XIII

Fig. 1. — Plaste à grana de la région vert pâle de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de vingt jours, onze jours après le traitement par une concentration de 5.10^{-4} de DSM.

Les lamelles intergrana sont rompues par endroits (flèches), ce qui entraîne une disposition irrégulière des grana. (Grossissement : 43.000).

Fig. 2. — Détail de l'ultrastructure d'une même plaste.

Les flèches montrent les ruptures des lamelles intergrana alors que la structure des grana, disposés irrégulièrement, ne semble pas altérée. (Grossissement : 86.000).

PLANCHE XIV

Plaste à grana de la région vert-jaune de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de vingt jours, onze jours après le traitement par une concentration de 5.10^{-4} de DSM.

Seuls subsistent quelques fragments de lamelles intergrana sous forme de vésicules alignées (va) ou de vésicules dispersées dans le stroma (ve). La structure des grana dispersés sans ordre dans le stroma ne semble pas altérée. (Grossissement : 46.000).

PLANCHE XV

Fig. 1. — Autre plaste à grana de la région vert-jaune montrant des grana disposés de manière anarchique sans le stroma hétérogène (s) dépourvu de tout système lamellaire. Le cliché suggère l'hypothèse d'une exaltation de la formation des saccules constituant les grana subsistants. (Grossissement : 35.000).

Fig. 2. — Plaste à grana de la région jaune-vert de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de vingt jours, onze jours après le traitement par une concentration de 5.10^{-4} de DSM. Il n'existe plus, dans ce type de plaste, de lamelles intergrana. Seules subsistent quelques vésicules (ve) dispersées dans le stroma (s) très hétérogène. Les grana (gr), peu nombreux, très longs, déformés, sont constitués de longs saccules souvent dilatés. (Grossissement : 35.000).

PLANCHE XVI

Fig. 1. — Plaste à grana de la région jaune de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de vingt jours, traitée par une concentration de 5.10^{-4} de DSM.

On n'observe, dans le plaste, qu'un seul granum de grande taille à saccules gonflés. Dans le stroma (s) sont dispersées de nombreuses vésicules (ve) dont certaines sont alignées (va). On remarque d'autre part, dans le stroma, des globules osmioréducteurs (flèches), qui semblent toutefois de nature différente de ceux que l'on observe dans les plastes normaux : leurs contours sont moins nets et leur contenu, moins réducteur, ne diffracte pas autant les électrons. (Grossissement : 28.000).

Fig. 2. — Plaste provenant de cellules de la région blanche de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de vingt jours traitée par une concentration 5.10^{-4} de DSM.

Le plaste est coupé transversalement au niveau d'amas de vésicules (vg) de tailles diverses ; certaines (flèches) osmioréductrices, ressemblent aux globules osmioréducteurs des plastes normaux. Il n'existe pas de structure lamellaire interne. Le stroma (s) ne diffracte les électrons que dans la région périphérique du plaste. Il apparaît « vide ». (Grossissement : 28.000).

PLANCHE XVII

Plastes sans grana de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de vingt jours, traitée par une concentration de 5.10^{-4} de DSM.

Fig. 1. — Plastes des cellules de la région vert pâle.

Le nombre des lamelles de stroma diminue ; certaines se groupent (flèche). On n'observe plus qu'une petite vésicule amylifère (a) dans le stroma (s) qui devient plus perméable aux électrons. (Grossissement : 43.000).

Fig. 2. — Plaste des cellules de la région jaune-vert.

Il n'existe plus que quelques lamelles de stroma très irrégulières, certaines montrant des ébauches de grana (ge). Le stroma devient très hétérogène. (Grossissement : 22.000).

PLANCHE XVIII

Plaste à grana de la région vert pâle de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs, âgée de vingt jours, traitée par une concentration de 5.10^{-4} d'AAMT.

Le chloroplaste a perdu sa forme très régulière. Les grana ne semblent pas altérés, alors que l'on observe des irrégularités dans la disposition des lamelles intergrana (l). Certaines d'entre elles se rompent (flèches). Enfin il faut noter dans le stroma la présence de très volumineux globules osmioréducteurs. (Grossissement : 43.000).

PLANCHE XIX

Plaste d'une cellule provenant d'une région identique à celle de la photographie précédente.

Le chloroplaste, très déformé, montre des grana à structure normale, des ruptures de lamelles intergrana (flèches), ainsi que de volumineux globules osmiophiles (go) dans le stroma qui devient hétérogène. (Grossissement : 42.000).

PLANCHE XX

Détail de la structure lamellaire interne d'une plaste de la région vert pâle de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de vingt jours, traitée par une concentration de 5.10^{-4} d'AAMT.

Les grana ont une structure normale. On constate que les deux feuillets des lamelles intergrana (l), appliqués ordinairement l'un contre l'autre, sont ici nettement séparés (flèches), ce qui rend les lamelles certainement plus fragiles et provoquent leur rupture. (Grossissement : 85.000).

PLANCHE XXI

Fig. 1. — Plaste à grana de la région vert-jaune de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de vingt jours, traitée par une concentration de 5.10^{-4} d'AAMT.

Les lamelles intergrana (l) plus minces se groupent en faisceaux irréguliers laissant voir un stroma hétérogène. Les grana (gr) perdent leur régularité. Les globules osmiophiles (go) sont encore volumineux. (Grossissement : 43.000).

Fig. 2. — Plaste à grana de la région jaune-vert de la même feuille. Il n'existe plus que quelques faisceaux de lamelles intergrana serrées les unes contre les autres. Les grana (gr) sont devenus aberrants. Le stroma, très perméable aux électrons, contient encore des globules osmiophiles de taille plus réduite. (Grossissement : 26.000).

PLANCHE XXII

Plaste sans grana de la région jaune de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de vingt jours, traitée par une concentration de 5.10^{-4} d'AAMT.

Le plaste, très déformé, amiboïde, ne contient que des faisceaux de tubules (ft) disposées en désordre dans un stroma très hétérogène (s). (Grossissement : 25.000).

PLANCHE XXIII

Plastes de la région blanche de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de vingt jours, traitée par une concentration de 5.10^{-4} d'AAMT.

Fig. 1. — Le plaste coupé en dehors de l'amas de vésicules est limité par sa double membrane (m). Dans la partie centrale du plaste, le stroma (s) ne diffracte pas les électrons. Il apparaît « vide ». Les mitochondries (mi) sont relativement pauvres en crêtes (cr), tandis que le cytoplasme est riche en substances osmiophiles. (Grossissement : 43.000).

Fig. 2. — Plaste sectionné au niveau de l'amas de vésicules (vg). On observe, dans ces vésicules groupées, quelques faisceaux de tubules coupés dans diverses directions (ft). En dehors de l'amas de vésicules, le stroma (s) est très perméable aux électrons. (Grossissement : 26.000).

PLANCHE XXIV

Cellules de la région dépigmentée de la deuxième feuille d'une plantule de Maïs âgée de vingt jours, traitée par une concentration de 5.10^{-4} d'AAMT.

Les mitochondries (mi) que l'on observe dans le cytoplasme pariétal des cellules ne montrent que de très petites crêtes et ont gardé, dans les cellules différenciées, un caractère juvénile, tandis que le cytoplasme est riche en substances osmioréductrices. (Grossissement : 70.000).

DEUXIÈME THÈSE

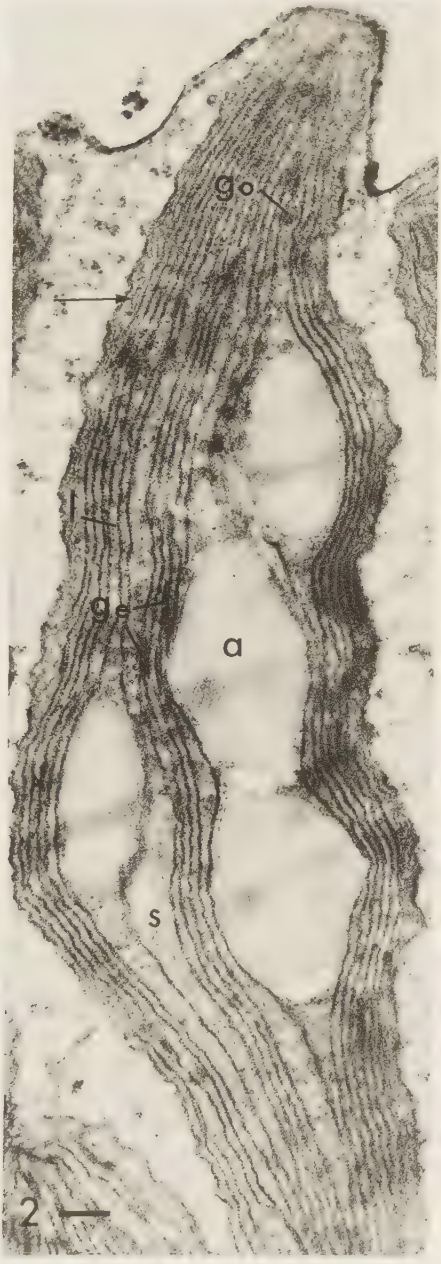
PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

" **Corrélations de croissance et d'inhibition entre bourgeons. Agents endogènes et exogènes intervenant dans ces corrélations.** "

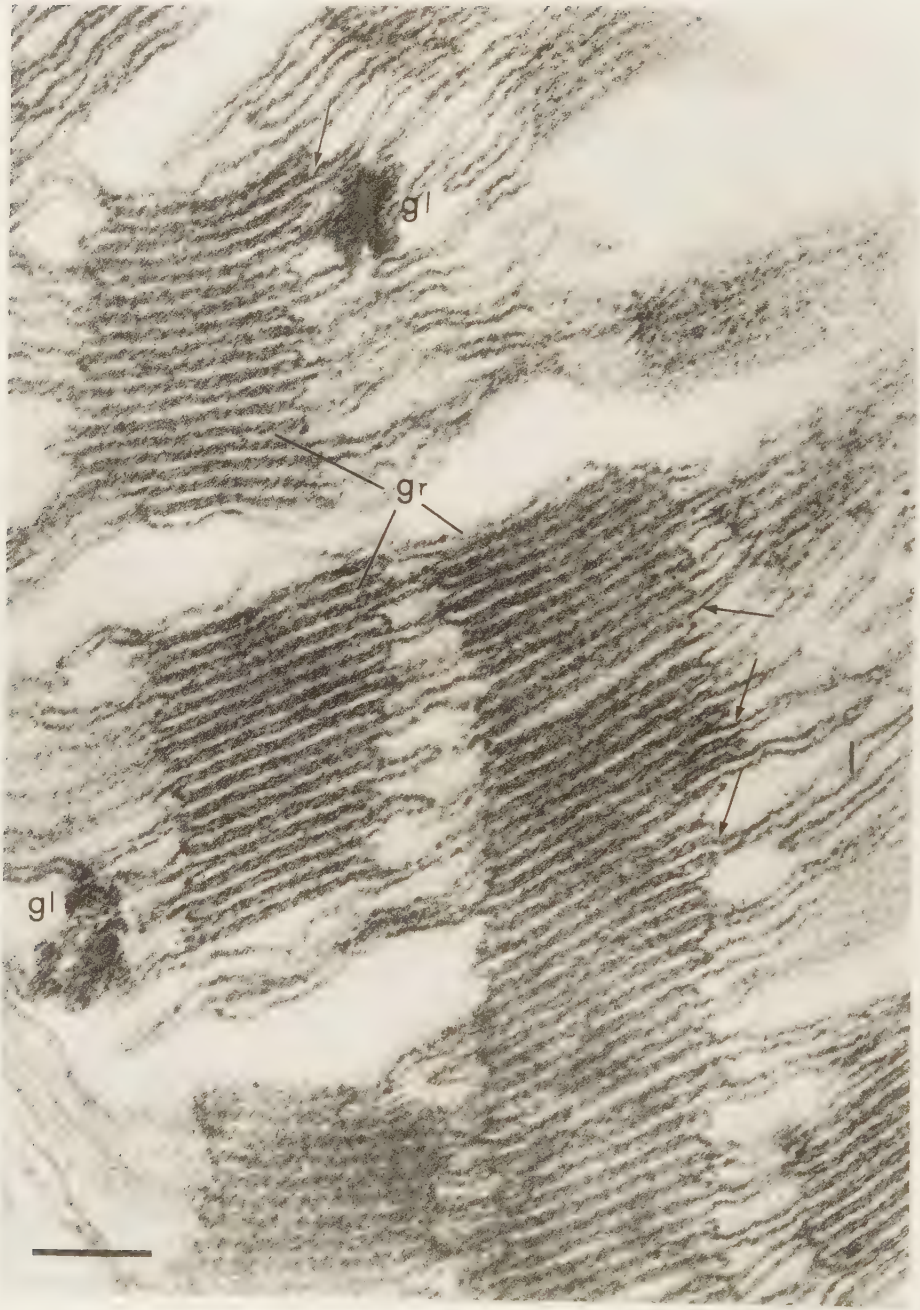
Vu et approuvé :
Paris, le 3 mai 1965
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Marc ZAMANSKY

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean ROCHE

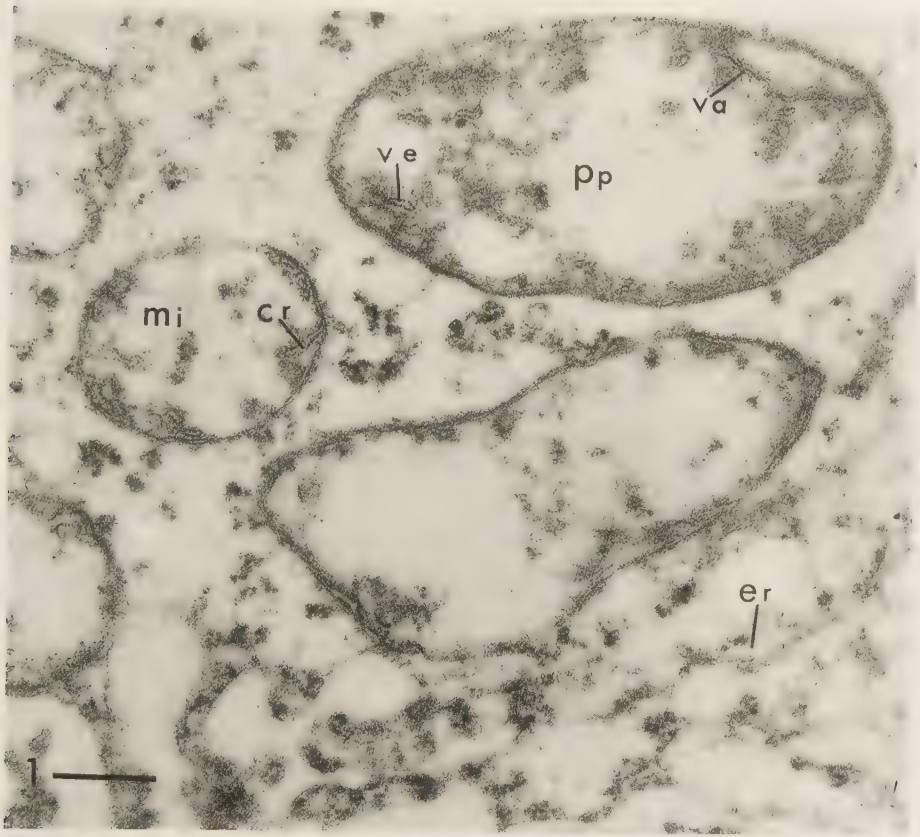
NEMOURS IMP. ANDRÉ LESOT. 15-7-65 - DÉPOT LÉGAL 65.3.628

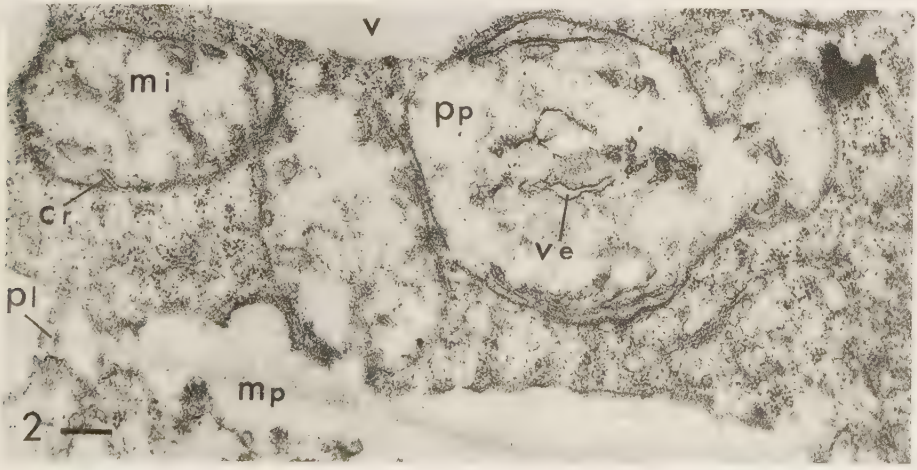


M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc.

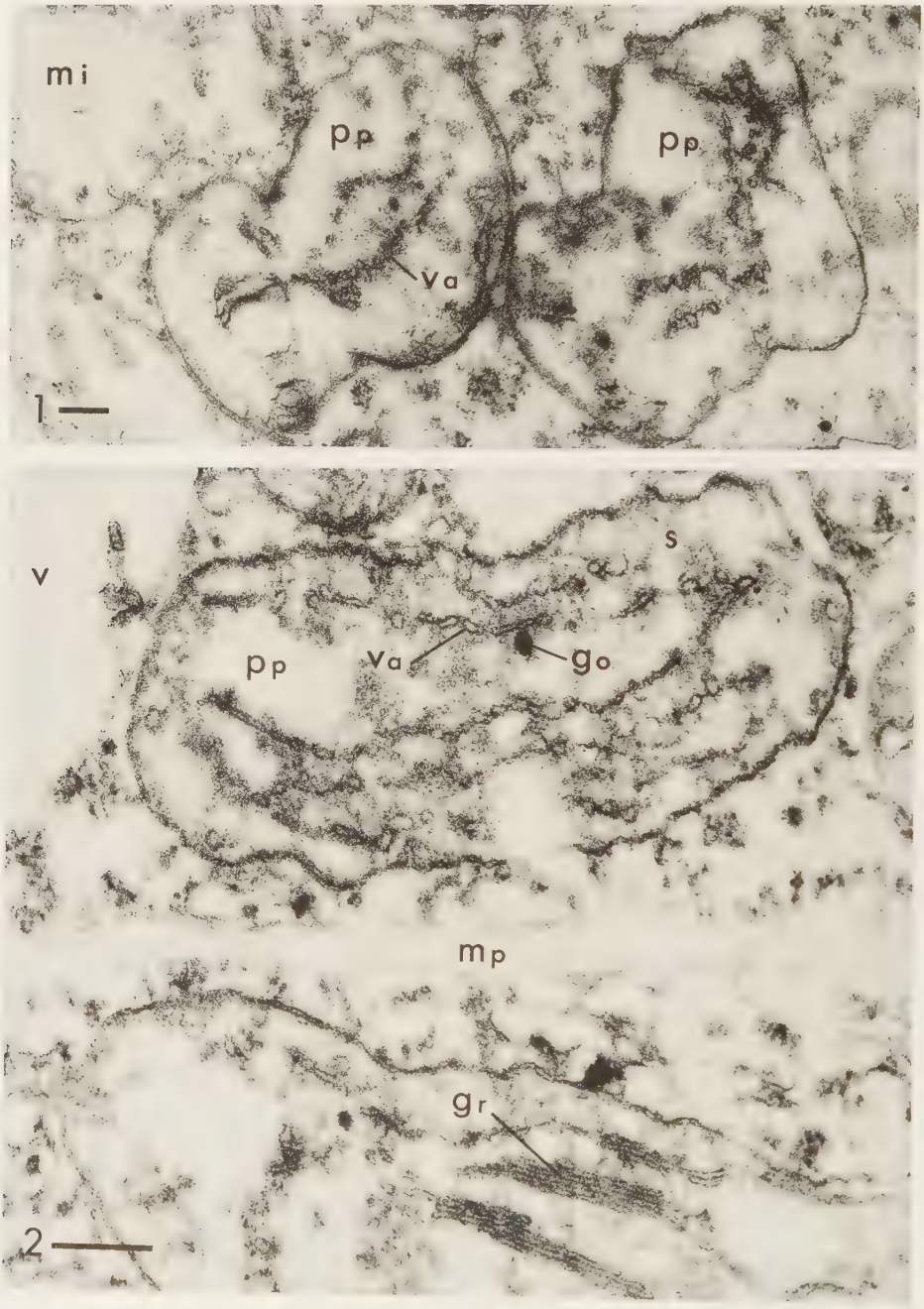


M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc.

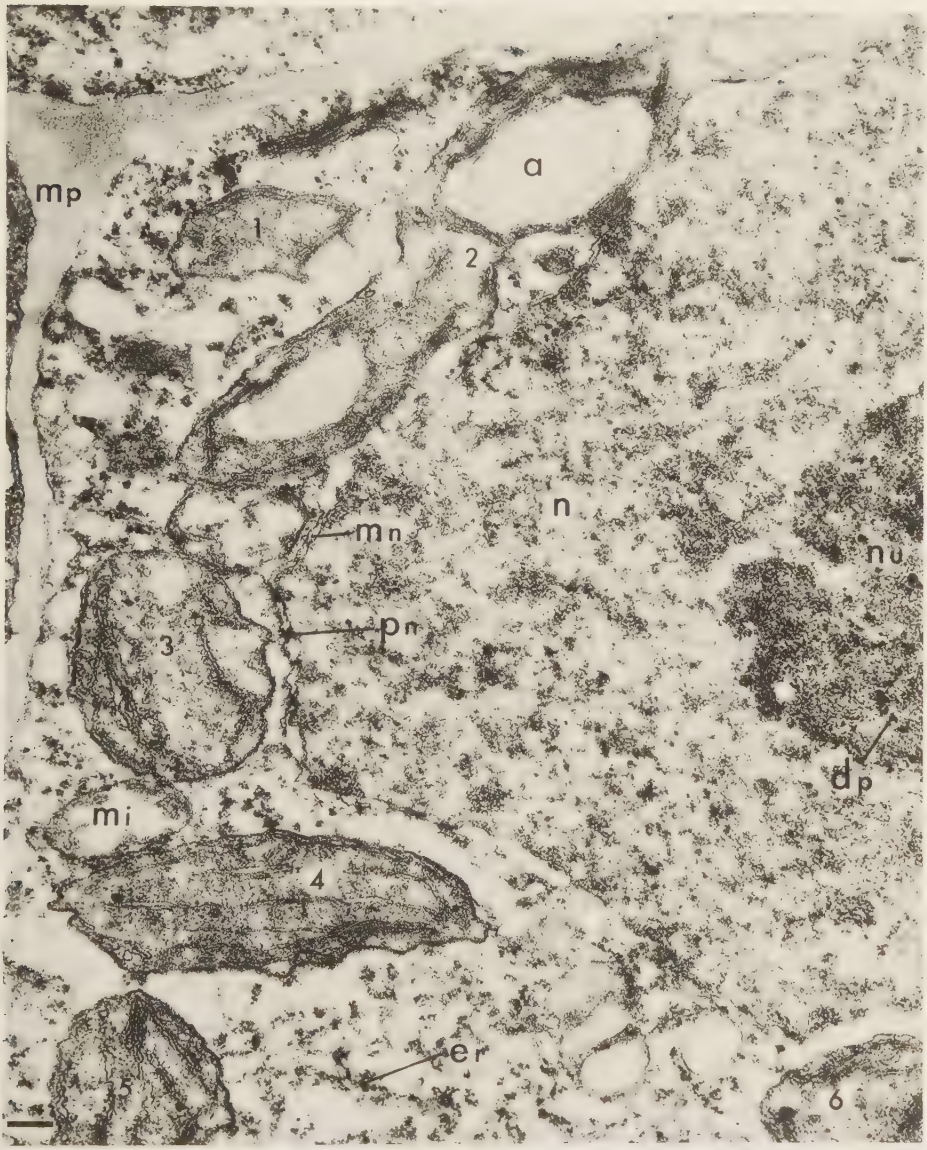




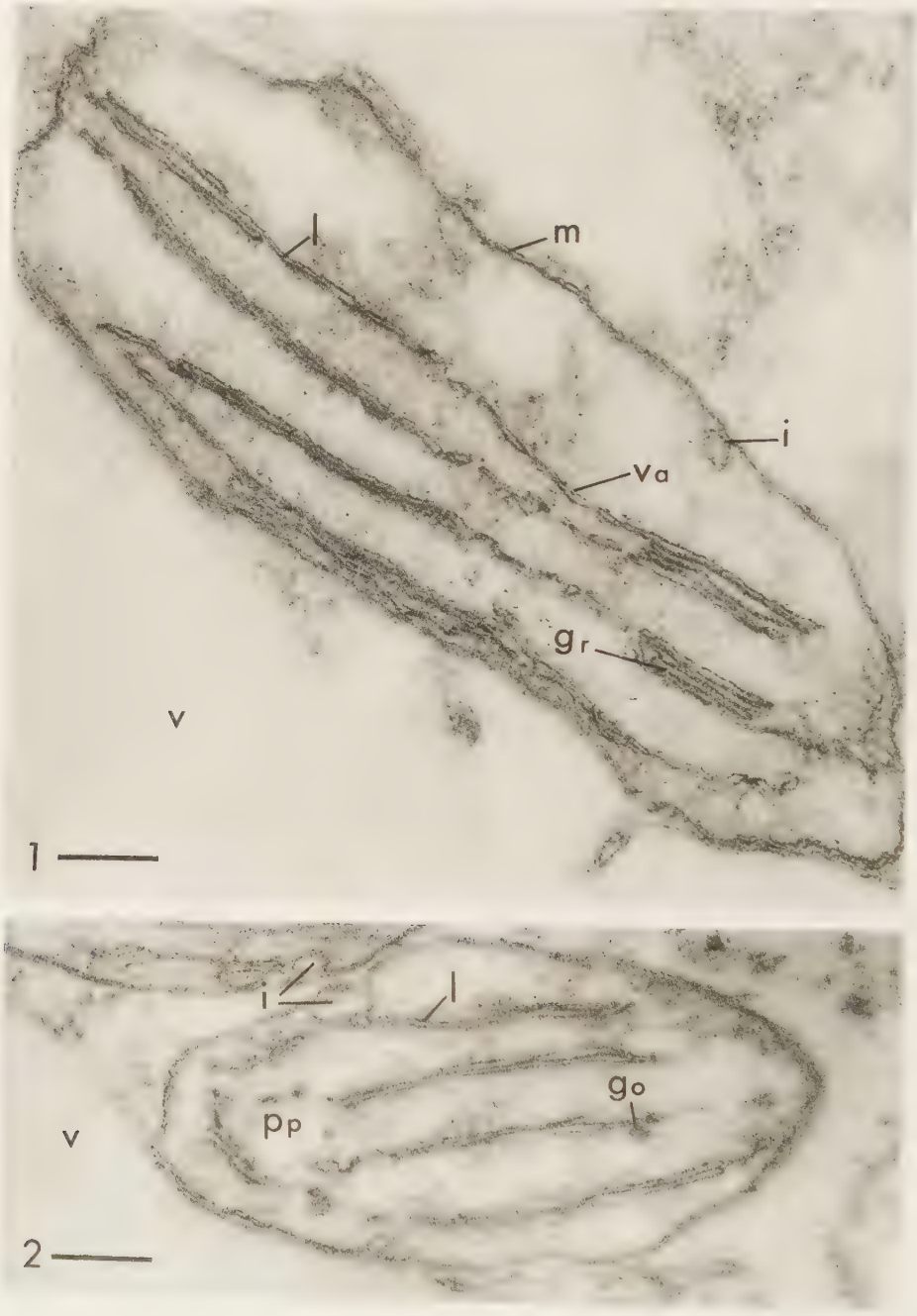
M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc.



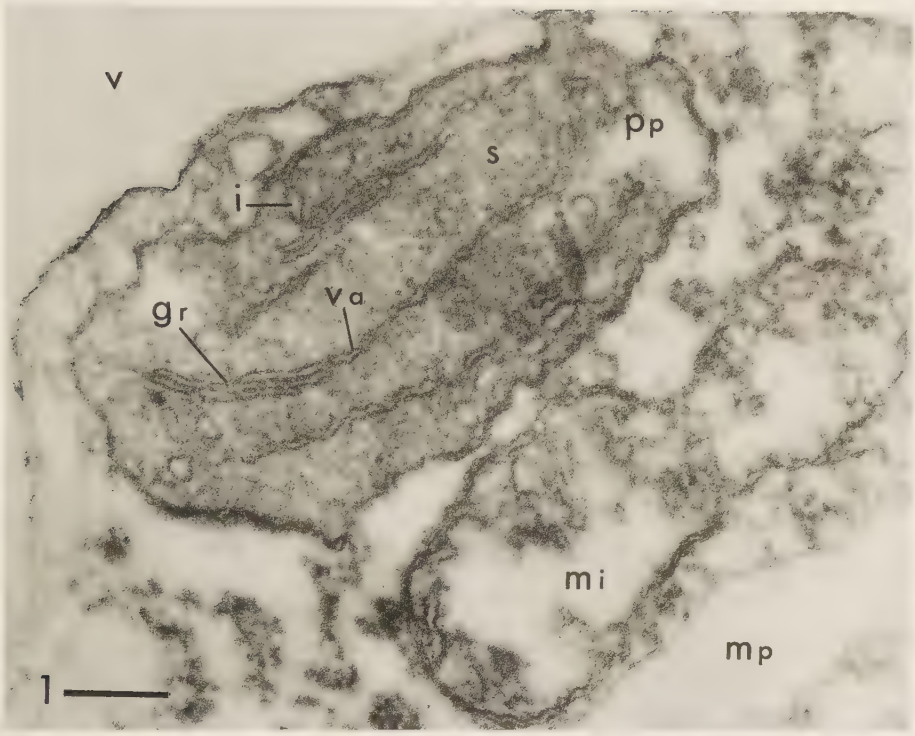
M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc.

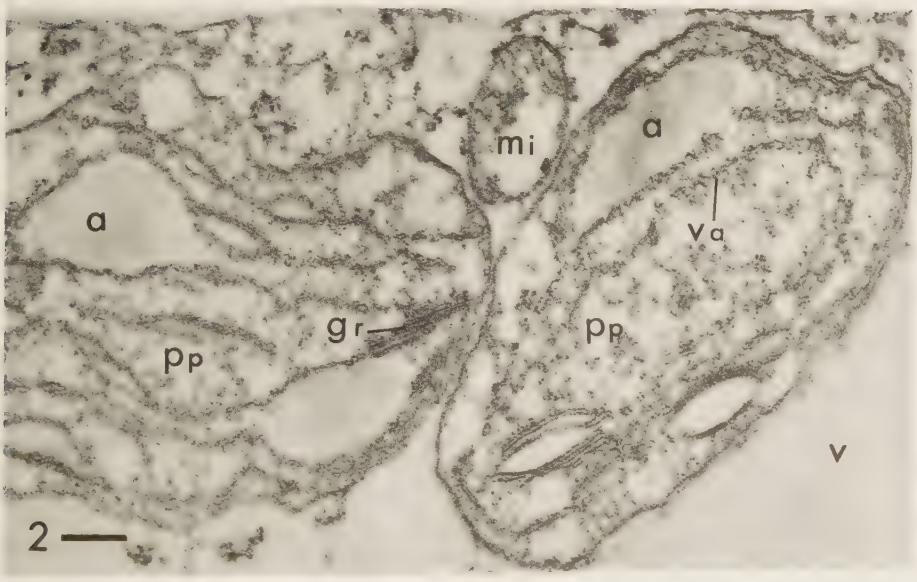


M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc.

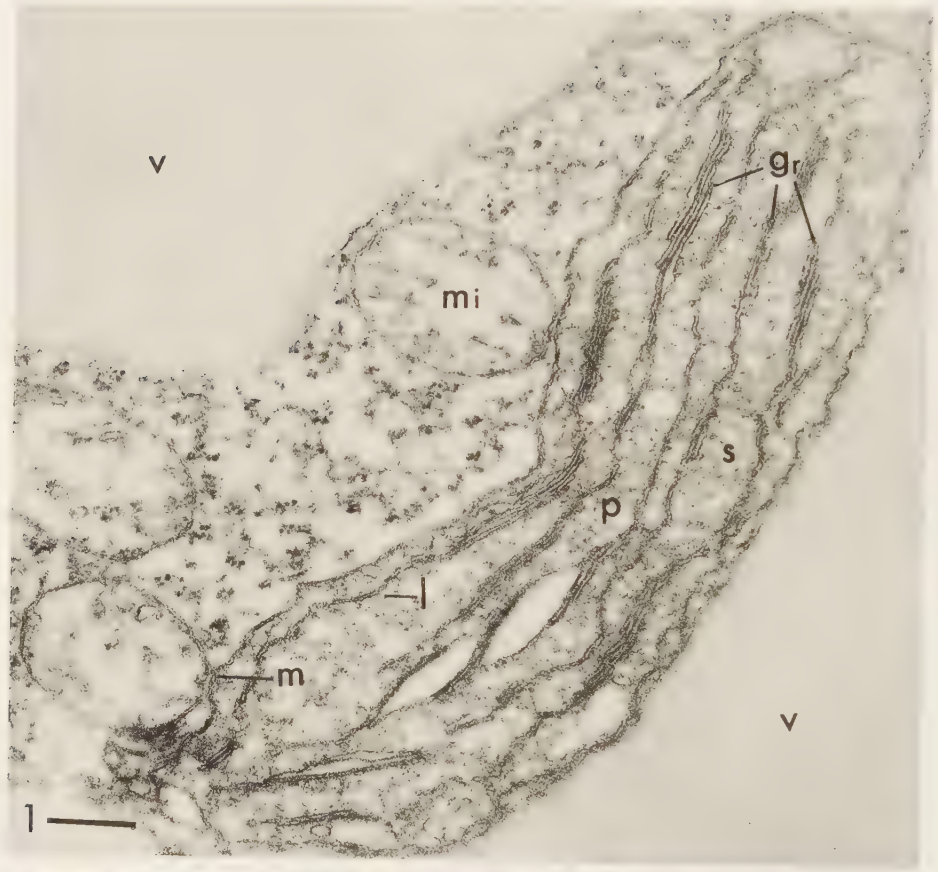


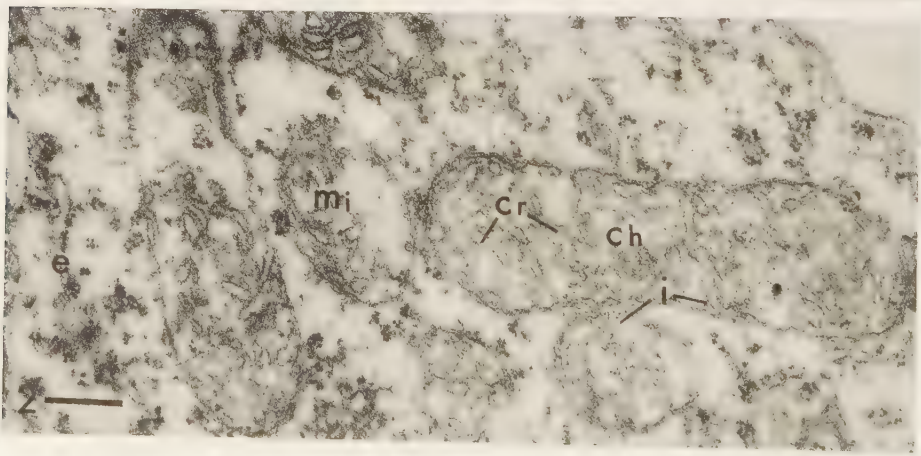
M. SIGNOL, phot. BRI NISSEN, sc.





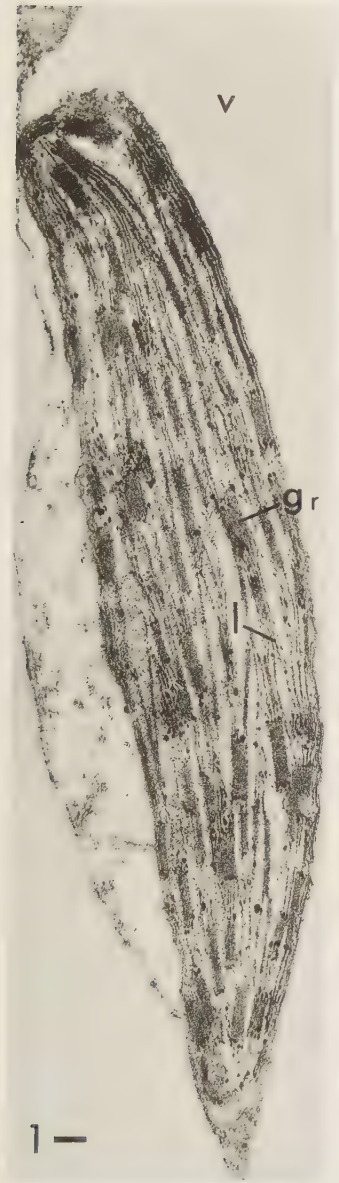
M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc.



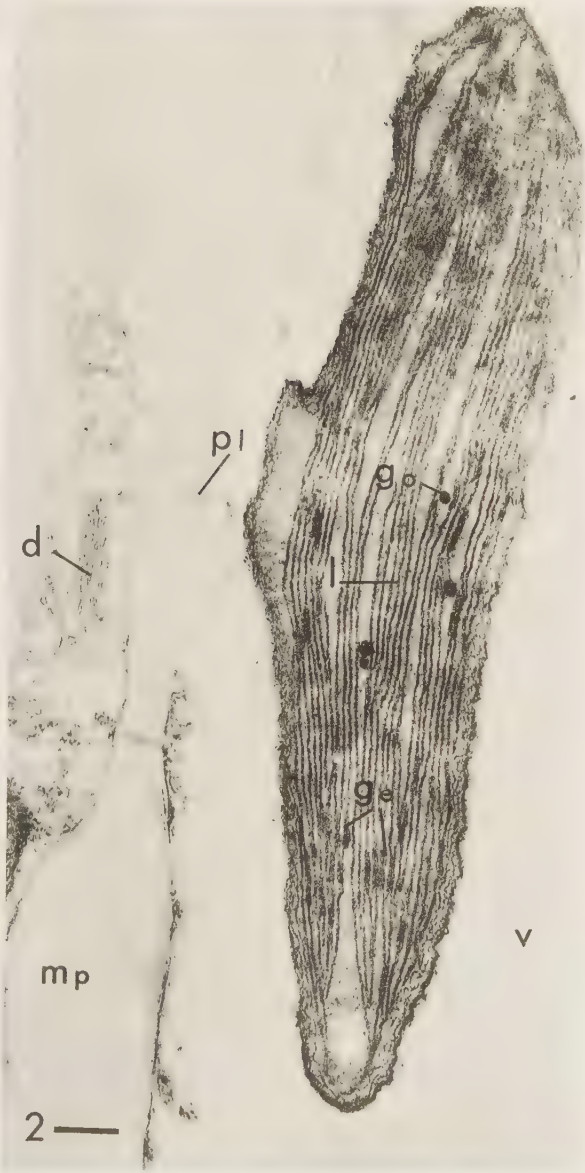


M. SIGNOL, phot.

BRUNISSEN, sc.



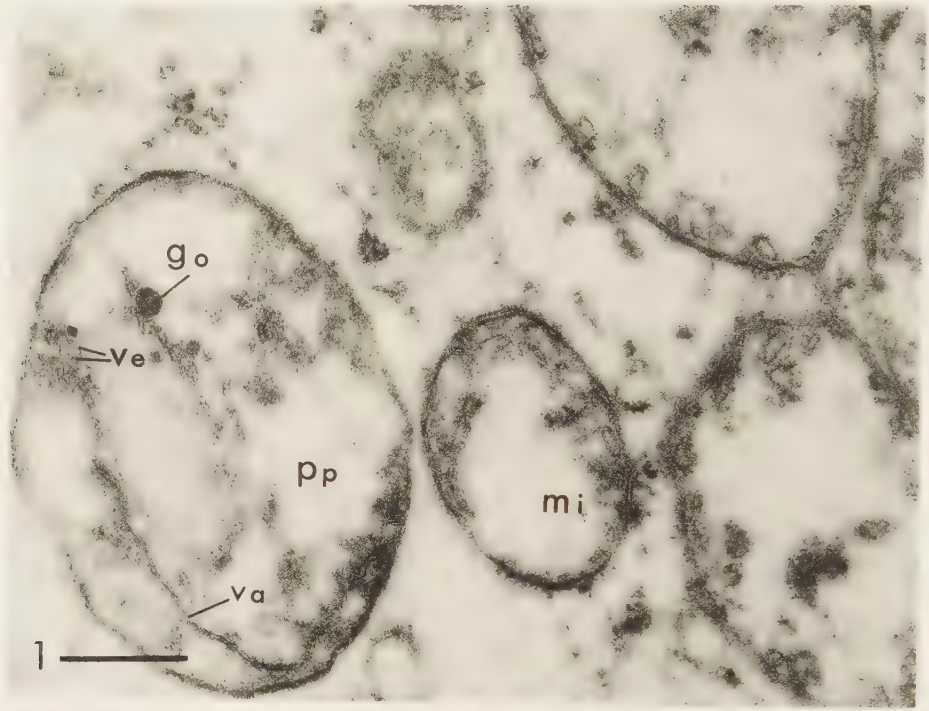
1 —

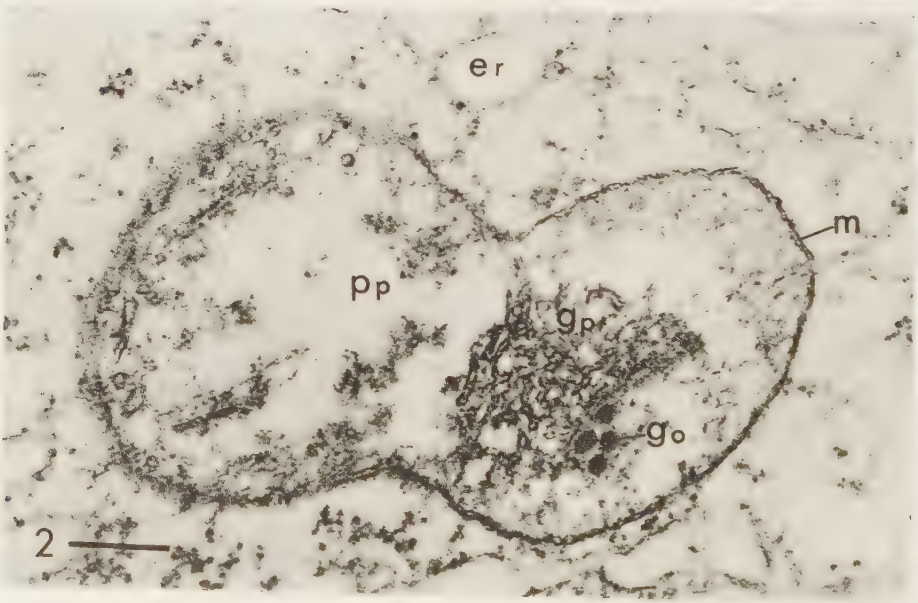


2 ——

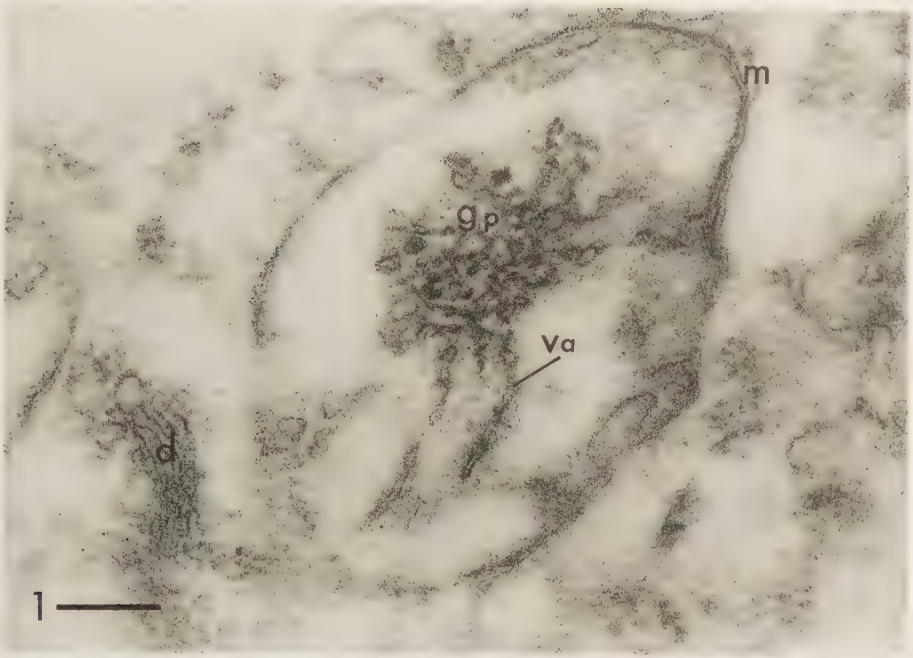
M. SIGNOL, phot.

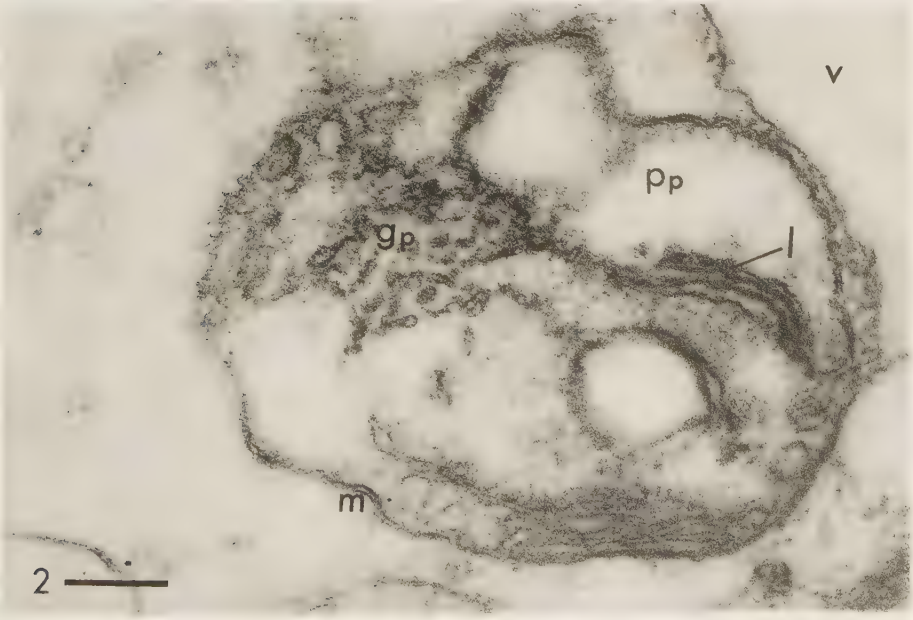
BRUNISSEN, sc.



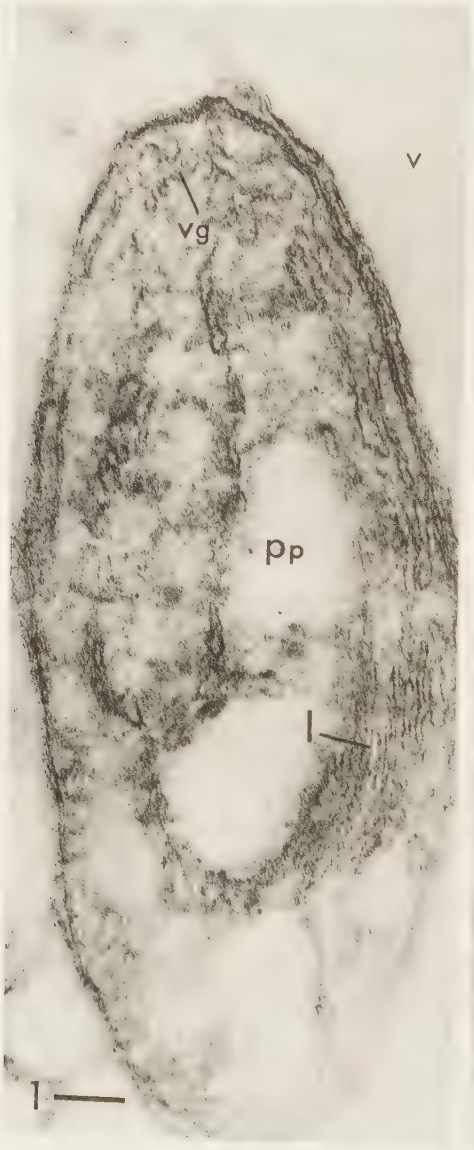


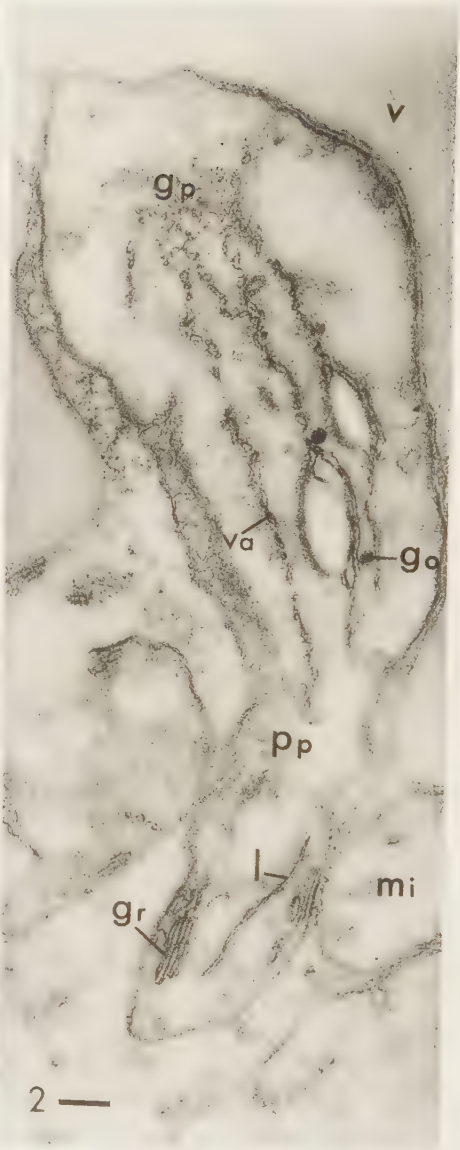
M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc.





M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc.

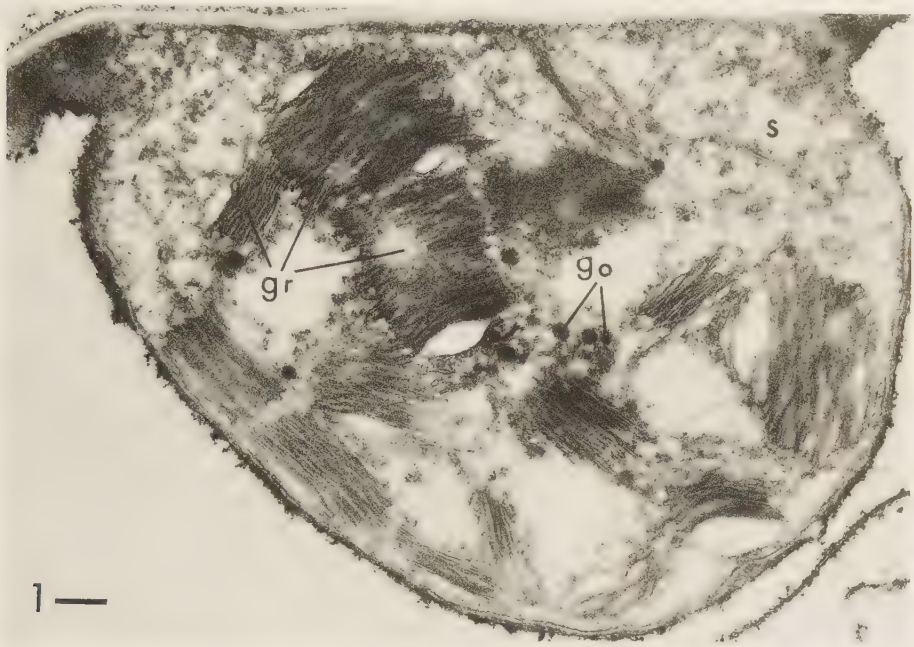




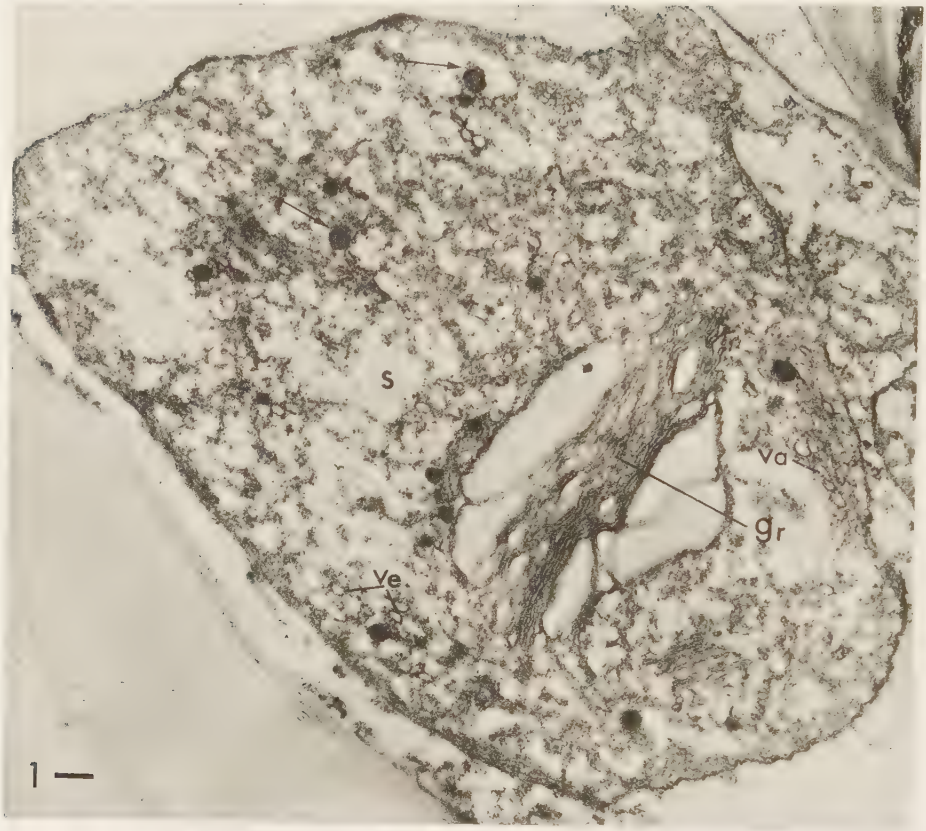
M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc

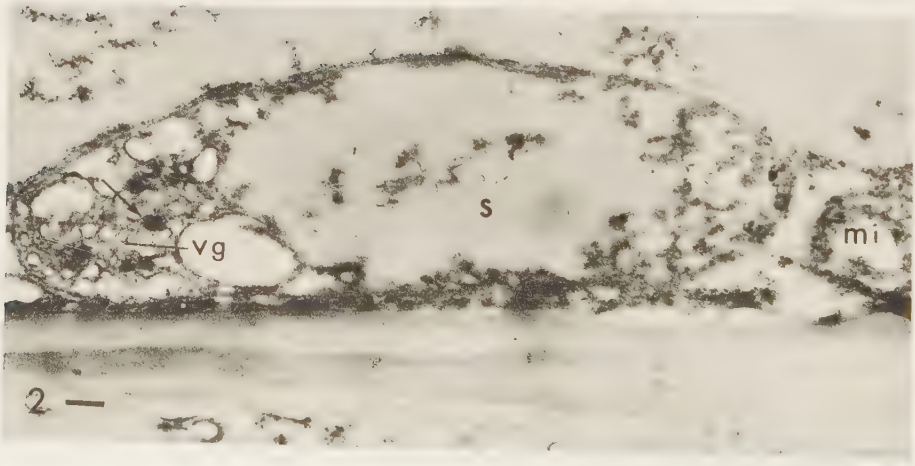
M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc

M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc.



M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN. sc





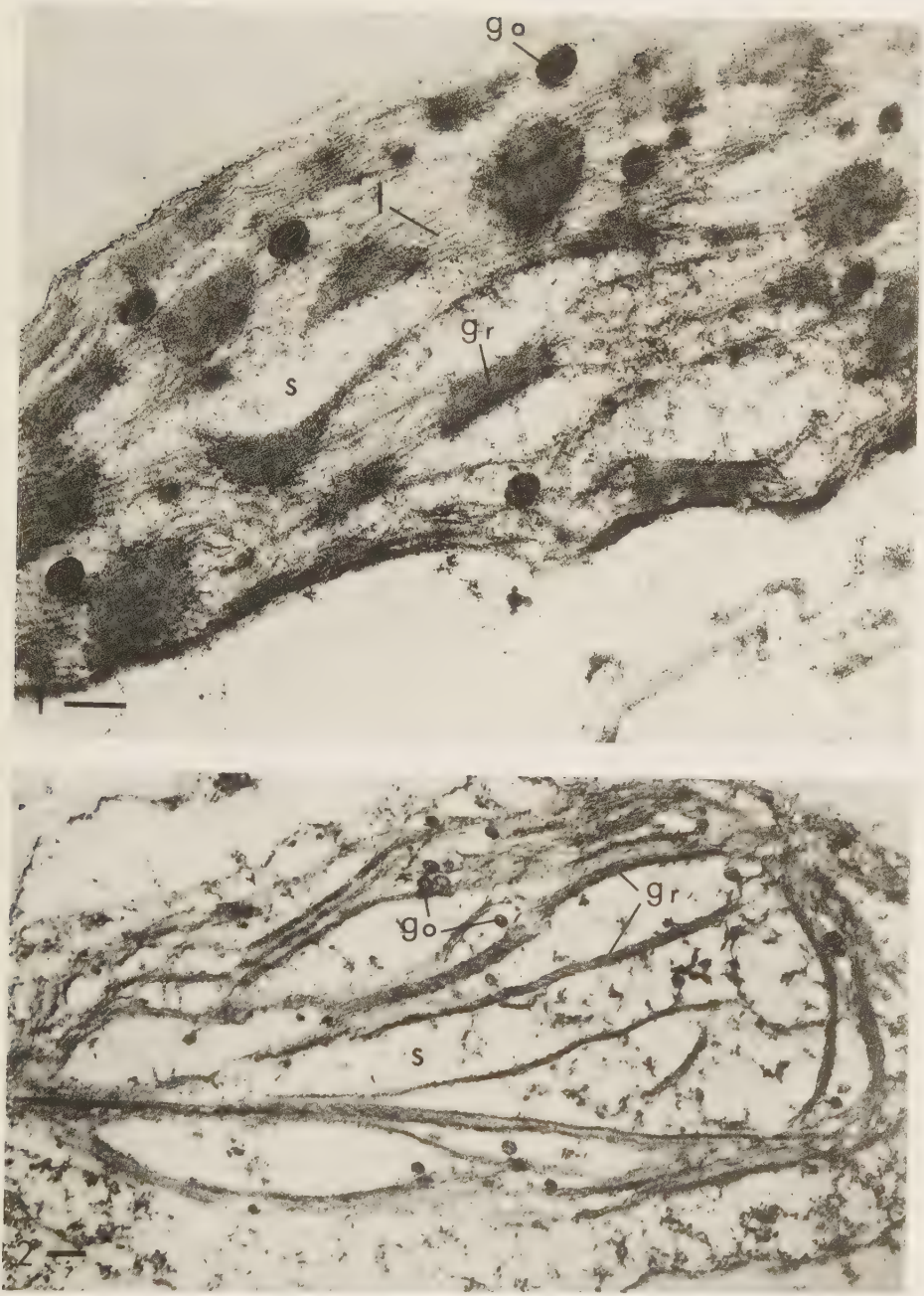
M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc

M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc.

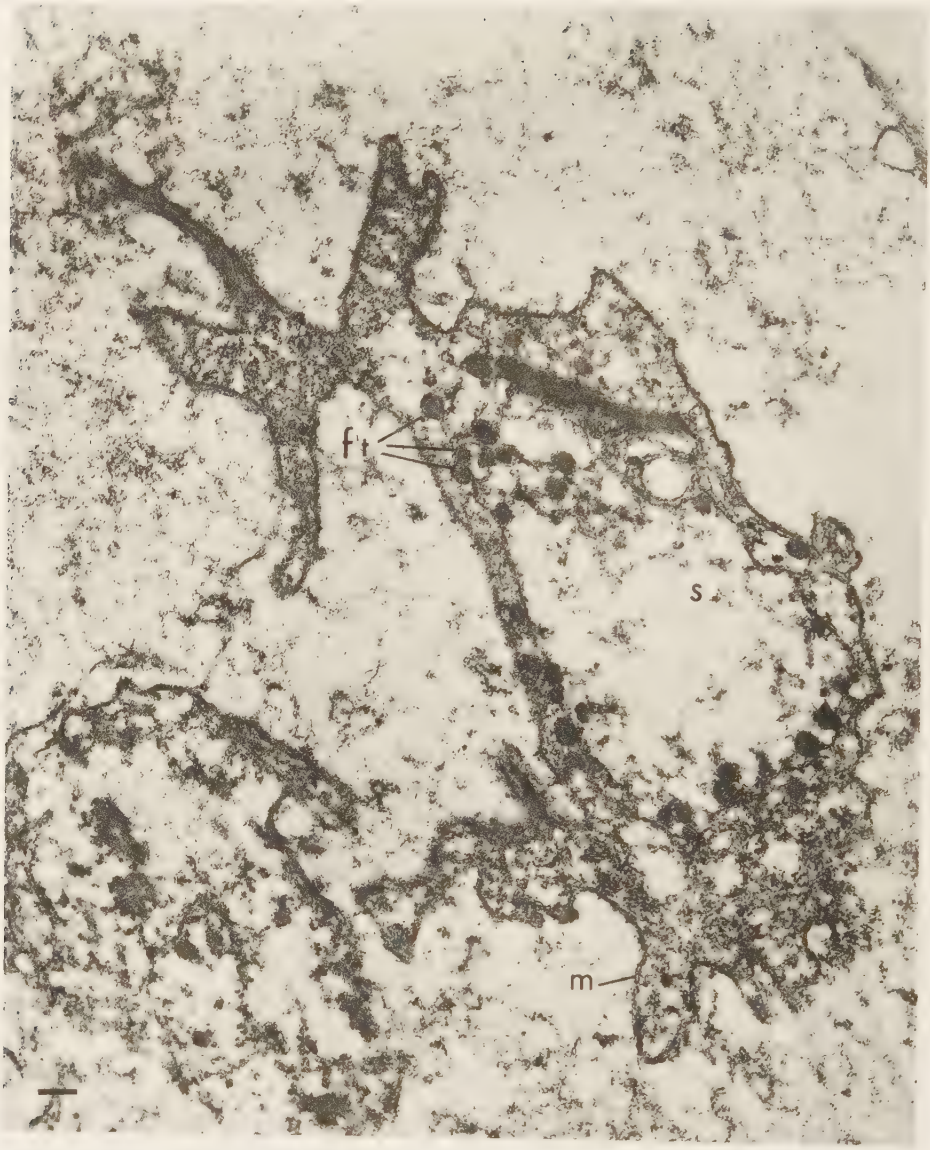
M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc.

M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc.

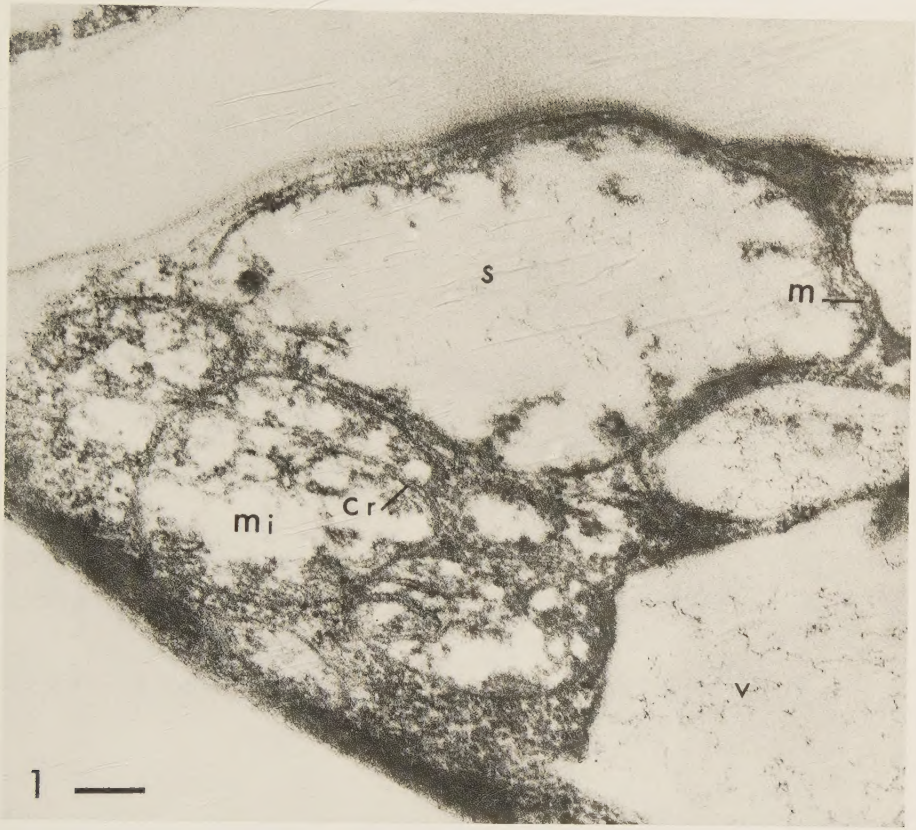
M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc.

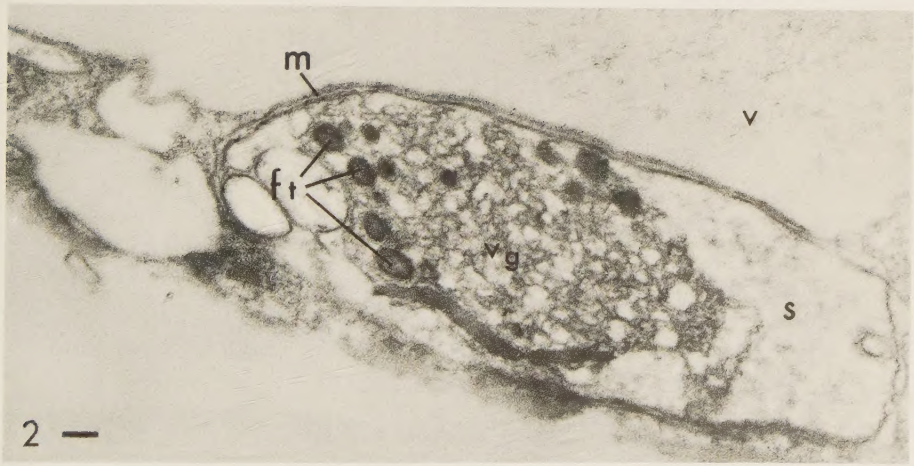


M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc.



M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc.





M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc.

M. SIGNOL, phot. BRUNISSEN, sc.